



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

**Autores: Rosas Criollo María Belén
 Terán Fuentes Diego Felipe**

Directora: Dra. Lucía Yépez Vásquez, Msc.

Ibarra – Ecuador

2015

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

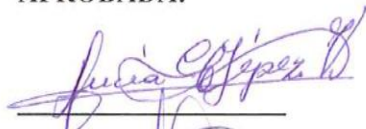
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888

Tesis revisada por la Directora y los Miembros del Tribunal, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA:



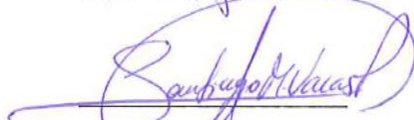
Dra. Lucía Yépez, Msc.

DIRECTORA



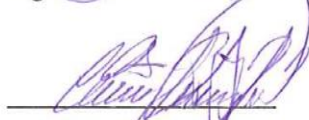
Ing. Jimmy Cuarán, Msc.

ASESOR



Ing. Marcelo Vacas, Msc.

ASESOR



Ing. Carlos Paredes

ASESOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejamos sentada nuestra voluntad de participar en este proyecto, para lo cual ponemos a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO		
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100291116-0	100286353-6
APELLIDOS Y NOMBRES:	Rosas Criollo María Belén	Terán Fuentes Diego Felipe
DIRECCIÓN:	Rocafuerte 21-19 y Tobías Mena	Chaltura, Obispo Mosquera y Amazonas
EMAIL:	mabel.rosas87@gmail.com	felikter_87@hotmail.com
TELÉFONO FIJO:	062600-804	062533-196
TELÉFONO MÓVIL:	0991970913	0991688383
DATOS DE LA OBRA		
TÍTULO:	OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	
AUTORES:	Rosas Criollo María Belén Terán Fuentes Diego Felipe	
FECHA:	12 de Junio de 2015	

SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO			
PROGRAMA:	X	PREGRADO	POSTGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial		
DIRECTORA:	Dra. Lucía Yépez Vásquez, Msc.		

2. AUTORIZACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

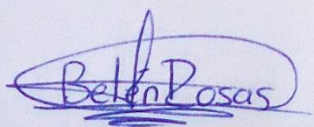
Nosotros, Rosas Criollo María Belén, con cédula de identidad número 100291116-0 y Terán Fuentes Diego Felipe, con cédula de identidad número 100286353-6; en calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hacemos entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizamos a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

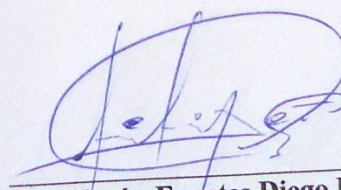
Los autores manifestamos que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y somos los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldremos en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 12 días del mes de Junio de 2015

LOS AUTORES:



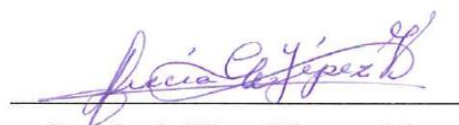
Rosas Criollo María Belén



Terán Fuentes Diego Felipe

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Rosas Criollo María Belén, con cédula de ciudadanía N° 100291116-0 y el Sr. Terán Fuentes Diego Felipe, con cédula de ciudadanía N° 100286353-6 bajo mi supervisión.

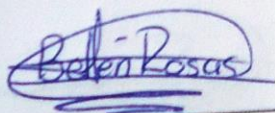


Dra. Lucía Yépez Vázquez, Msc.
DIRECTORA DE TESIS

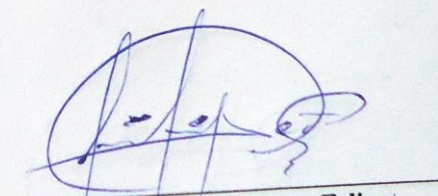
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, Rosas Criollo María Belén, con cédula de identidad Nro. 100291116-0, y yo Terán Fuentes Diego Felipe, con cédula de identidad Nro. 100286353-6 manifestamos nuestra voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autores de la obra o trabajo de grado denominado: **OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888**, que ha sido desarrollado para optar por el título de: **INGENIERO AGROINDUSTRIAL** en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 12 días del mes de Junio de 2015



Rosas Criollo María Belén


Terán Fuentes Diego Felipe

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a **Dios**, quién supo guiarnos por el buen camino, dándonos fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándonos a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Agradecemos a la **Universidad Técnica del Norte**, que mediante: la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, sus autoridades y docentes, supieron abrirnos las puertas y brindarnos de una manera desinteresada todo su apoyo, compartiéndonos sus saberes y logrando de esta manera formarnos como entes de sabiduría y valores, dispuestos a contribuir con la sociedad.

De manera especial a la **Dra. Lucía Yépez**, Directora de Tesis, a quien agradecemos por su valioso tiempo brindado, por el apoyo incondicional y por impulsarnos a alcanzar nuestros sueños.

A nuestros asesores, **Ing. Jimmy Cuarán, Ing. Marcelo Vacas e Ing. Carlos Paredes**, a los docentes **Dr. José Luis Moreno, Ing. Jorge Torres e Ing. Ernesto Terán**, gracias por el aporte que han hecho a este trabajo y por sus sabios consejos, que nos han ayudado a crecer profesionalmente.

A nuestros **padres**, por su apoyo, sus consejos, su comprensión, su amor y su ayuda en los momentos difíciles, y sobre todo, por brindarnos los recursos necesarios para culminar con éxito nuestros estudios. Ellos han forjado en nosotros nuestros principios, nuestros valores, la perseverancia y el coraje para conseguir nuestros objetivos.

A toda nuestra **familia**, que de una u otra manera han contribuido en el desarrollo de esta investigación.

La vida en el aula no hubiera sido la misma sin haber compartido tantas alegrías, es por esto que queremos agradecer a nuestros amig@s, quienes compartieron junto a nosotros tantos momentos divertidos e inolvidables, gracias a la Belencita, a la Reinita, a la Alis, al Gualitas, al Pepito, al Chavito, al Luchito y al Julio.

A todos ustedes infinitas gracias.

Belén y Felipe

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta investigación con todo el cariño a:

Dios por darme la vida, por permitirme culminar con éxito mi carrera,
por ser luz en mi vida y la fortaleza de cada día.

A papá y mamá que me han apoyado y han estado conmigo siempre
fortaleciéndome y alentándome para seguir adelante.
Les quiero con todo mi corazón y este logro es para ustedes.

A mis hermanos **Verónica, Javier y Andrés** por su cariño, apoyo y
ayuda incondicional en todo momento, porque son para mí un ejemplo
de lucha, trabajo, responsabilidad y generosidad.

A mi amigo, compañero y confidente **Felipe** por todo el amor que Dios nos ha regalado,
porque de su mano vamos a caminar juntos para toda la vida.
Gracias por tu paciencia, comprensión y alegría en todo momento.
Te amo! Y seguiremos triunfando juntos.

A nuestra preciosa hija **Camilita** por la fuerza que ha dado a nuestras vidas,
porque con tu sonrisa y tus ocurrencias alegras nuestros días.
Eres un regalo de Dios princesa.

A Fr. Oscar Pérez Rodríguez gracias por la amistad incondicional, por el apoyo
constante, las palabras de aliento y sabios consejos en los momentos difíciles.
“Amistad que duplica las alegrías y divide las tristezas”

Gracias a tod@s familia y amig@s por su apoyo, tiempo, cariño y oración.

Belén

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado con todo mi cariño:

Principalmente a Dios que gracias a él y a su misericordia infinita he logrado llegar tan lejos en mi vida y cumplir con éxito mis objetivos, gracias a él que ha derramado sobre mí su infinita sabiduría.

A mi Mamita Inesita, como no dedicarte todo este esfuerzo a ti, si tú has dado tu vida entera para sacarnos adelante a mi hermana y a mí, te quiero mamita linda, todo este esfuerzo te lo debo a ti, eres una bendición madre mía.

A mi Nani Sarita, tú has estado en todos los momentos de mi vida, en los buenos y en los mejores, siempre hemos estado juntos ñaña y aunque no te lo diga muy a menudo quiero que sepas que te quiero mucho.

A mi querida Mabel, tu que has estado junto a mí en todo este tiempo, gracias a ti, a tu esfuerzo y a tu dedicación hemos podido culminar juntos este trabajo al cual le hemos puesto todo nuestro empeño, sin ti toda esta investigación no habría sido nada.

Como no dedicar esto a mi princesa Camilita, déjame decirte que eres el pilar fundamental en mi vida, eres mi razón de ser, eres la principal inspiración para esforzarnos junto con tu mamita Mabel para lograr culminar nuestros estudios, siéntete orgullosa de tus papitos mi chiquita hermosa, te amamos con todo nuestro corazón.

A toda mi familia que de una u otra forma me supieron apoyar en todo momento, gracias por estar siempre pendientes y darle seguimiento a este trabajo, gracia por todos esos consejos y por todas esas palabras de aliento.

Por último, quiero dedicar este trabajo a Papá, sé que tú has estado siempre a mi lado guiándome y rogando a Dios por mí, tienes la ventaja de estar junto a él, aunque te adelantaste a tu partida el tiempo que estuviste a mi lado fue muy especial dejaste sembrando en mi todo lo que soy, gracias “Negro”, aunque te extraño mucho sé que siempre estas a mi lado.

Felipe

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO I	3
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 PROBLEMA	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
1.3 OBJETIVOS.....	5
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	6
1.4.1 HIPÓTESIS AFIRMATIVA	6
1.4.2 HIPÓTESIS NULA	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1 AGROINDUSTRIA PANELERA EN EL ECUADOR.....	7
2.2 AGROINDUSTRIA PANELERA EN LA PROVINCIA DE IMBABURA	8
2.2.1 SUBPRODUCTOS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE PANELA	8
2.2.1.1 Cachaza.....	9
2.2.1.1.1 Definición	9
2.2.1.1.2 Obtención	9
2.2.1.1.3 Producción de cachaza.....	10
2.2.1.1.4 Composición química de la cachaza.....	10
2.2.1.1.5 Usos	10
2.3 INDUSTRIA AZUCARERA EN EL ECUADOR.....	11
2.4 INDUSTRIA AZUCARERA EN LA PROVINCIA DE IMBABURA.....	11

2.4.1	INGENIO SAN JOSÉ	11
2.4.2	INGENIO AZUCARERO DEL NORTE	12
2.4.3	SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AZUCARERA	13
2.4.3.1	Melaza	14
2.4.3.1.1	Definición	14
2.4.3.1.2	Obtención	14
2.4.3.1.3	Producción de melaza	14
2.4.3.1.4	Composición química de la melaza	15
2.4.3.1.5	Usos	15
2.5	<i>Aspergillus niger</i>	15
2.5.1	DESCRIPCIÓN	16
2.5.2	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	17
2.5.3	ASPECTOS NUTRICIONALES	17
2.5.4	REQUERIMIENTOS DE FERMENTACIÓN	18
2.6	ÁCIDO CÍTRICO	19
2.6.1	DEFINICIÓN	19
2.6.2	ANTECEDENTES	19
2.6.3	MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y RENDIMIENTO	20
2.6.4	CARACTERÍSTICAS GENERALES	21
2.6.4.1	Pureza	21
2.6.5	PRINCIPALES USOS	22
2.7	CRISTALIZACIÓN	23
2.7.1	PROCESOS DE CRISTALIZACIÓN MÁS COMUNES	24
2.7.1.1	Fabricación del grano por el método antiguo	24
2.7.1.2	El semillamiento por choque	24
2.7.1.3	El semillamiento de tachos	25
2.7.2	IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE LOS CRISTALES	27
2.8	CURVAS DE CRECIMIENTO DE UN MICROORGANISMO	27
2.8.1	LA FASE DE LATENCIA	28
2.8.2	LA FASE LOGARÍTMICA O EXPONENCIAL	28
2.8.3	LA FASE ESTACIONARIA	28
2.8.4	LA FASE DE MUERTE	29

CAPÍTULO III	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 MATERIALES.....	30
3.1.1 MATERIAS PRIMAS E INSUMOS	30
3.1.1.1 Materias primas	30
3.1.1.2 Insumos.....	30
3.1.2 EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO	31
3.1.2.1 Equipos	31
3.1.2.2 Materiales de laboratorio	31
3.2 MÉTODOS.....	32
3.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	32
3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
3.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO.....	33
3.2.4 UNIDAD EXPERIMENTAL.....	33
3.2.5 ESQUEMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
3.2.6 ANÁLISIS FUNCIONAL.....	33
3.2.7 FACTORES EN ESTUDIO	34
3.2.8 TRATAMIENTOS	34
3.2.9 VARIABLES A EVALUARSE.....	35
3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO	35
3.3.1 REPRODUCCIÓN DE LA CEPA	35
3.3.2 ETAPA DE FERMENTACIÓN.....	35
3.3.3 ETAPA DE PURIFICACIÓN	36
3.3.4 ETAPA DE CRISTALIZACIÓN.....	37
3.4 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO	39
3.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO	39
3.4.1.1 Reproducción y conservación de la cepa.....	39
3.4.1.2 Etapa de fermentación	40
3.4.1.3 Etapa de purificación	40
3.4.1.4 Etapa de cristalización	41

CAPÍTULO IV.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 VARIABLE CURVAS DE PH	43
4.2 VARIABLE RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO.....	44
4.3 VARIABLE PUREZA DEL PRODUCTO TERMINADO	48
4.4 VARIABLE HUMEDAD DEL PRODUCTO TERMINADO	49
4.5 VARIABLE TIEMPO DE FERMENTACIÓN	51
4.5.1 CURVA DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN	54
4.6 INTERACCIONES	55
4.6.1 RENDIMIENTO - PUREZA.....	55
4.6.2 PUREZA – TIEMPO DE FERMENTACIÓN	56
4.7 BALANCE DE MATERIALES.....	57
4.8 COSTOS DE PRODUCCIÓN.....	61
CAPÍTULO V	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1 CONCLUSIONES.....	62
5.2 RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO VI.....	65
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes físicos – químicos de la cachaza.....	10
Tabla 2. Componentes físicos – químicos de la melaza	15
Tabla 3. Taxonomía de <i>Aspergillus niger</i>	17
Tabla 4. Características del ácido cítrico	21
Tabla 5. Ubicación y datos meteorológicos del experimento.....	32
Tabla 6. ADEVA	33
Tabla 7. Descripción de Factores	34
Tabla 8. Descripción de Tratamientos	34
Tabla 9. Mediciones de pH durante el proceso de fermentación.....	43
Tabla 10. Valores de producción en gramos de ácido cítrico.....	46
Tabla 11. ADEVA	46
Tabla 12. Prueba de significación de Tukey al 5 % para tratamientos: Rendimiento del ácido cítrico	47
Tabla 13. Prueba de significación DMS para el factor A (porcentaje de inóculo).....	47
Tabla 14. Valores de humedad del ácido cítrico	50
Tabla 15. ADEVA	50
Tabla 16. Valores del tiempo de fermentación.....	51
Tabla 17. ADEVA	52
Tabla 18. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos: Tiempo de fermentación	52
Tabla 19. Prueba de significación DMS para el factor N (cantidad de nutriente).....	53
Tabla 20. Resultados de Rendimiento y Pureza en el producto final	55
Tabla 21. Resultados de Pureza – Tiempo de fermentación.....	56
Tabla 22. Costos de producción de ácido cítrico.....	61
Tabla 23. Costos de los tipos de ácido cítrico en el mercado local	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presentaciones de azúcar.....	11
Figura 2. Morfología del género <i>Aspergillus</i>	16
Figura 3. La curva de crecimiento de un microorganismo	27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curvas de pH de los cuatro mejores tratamientos.....	44
Gráfico 2. Rendimiento del ácido cítrico (g / l).....	45
Gráfico 3. Comportamiento de las medias de rendimiento en la obtención de ácido cítrico	48
Gráfico 4. Pureza del producto obtenido	49
Gráfico 5. Comportamiento de las medias de humedad en la obtención de ácido cítrico..	51
Gráfico 6. Comportamiento de las medias en el tiempo de fermentación para la obtención de ácido cítrico.....	53
Gráfico 7. Curva de crecimiento de los cuatro mejores tratamientos.....	54
Gráfico 8. Interacción Rendimiento - Pureza	55
Gráfico 9. Interacción Pureza – Tiempo de Fermentación	56

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Presentación de panela en el sector	7
Fotografía 2. Subproductos de la industria panelera	9
Fotografía 3. <i>Aspergillus niger</i> visto al microscopio	15
Fotografía 4. Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Análisis físicos químicos de melaza y cachaza.....	68
ANEXO 2	Análisis de humedad del producto terminado.....	69
ANEXO 3	Análisis de pureza	70
ANEXO 4	Norma INS N° 330 Codex Alimentarius.....	75
ANEXO 5	Descripción de uso del KWIK - STIK	77
ANEXO 6	Ficha Técnica de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	78
ANEXO 7	Ficha de seguridad de material microbiológico	80
ANEXO 8	Ficha técnica de hidróxido de calcio.....	84
ANEXO 9	Partes del biorreactor	85
ANEXO 10	Descripción del proceso para la obtención de ácido cítrico.....	86

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888, esta investigación genera una alternativa para mejorar el uso de estas materias primas, obtenidas de las industrias azucareras y paneleras respectivamente.

Esta investigación consto de tres etapas, las cuales fueron: fermentación, purificación y cristalización. En la etapa de fermentación se controló temperatura, aireación, pH, °Brix, agitación (rpm); estos parámetros son fundamentales en el desarrollo del microorganismo, el tiempo de fermentación depende de los componentes de cada tratamiento. Para la etapa de purificación se llevó el líquido fermentado a temperatura de 50 °C, para luego añadir hidróxido de calcio al 10 % hasta llegar a un pH neutro ($7 \pm 0,5$) con el cual se formó citrato cálcico, que es separado mediante centrifugación, después de varios lavados se adicionó ácido sulfúrico al 10 %, que reacciona con el citrato cálcico y se precipita en forma de yeso o sulfato cálcico, permitiendo así liberar el ácido cítrico que se encuentra en forma líquida, el cual pasa a la siguiente etapa de cristalización, en donde se concentró el ácido cítrico líquido a 40 °Brix. Se retiró el concentrado del evaporador y se colocó en un recipiente para ser llevado a baño maría, en el que se trabajó a 38 ± 1 °C y agitación constante, se agregó 1 ml de la solución semilla, posterior a esto se observó la formación de los primeros cristales que son de tamaño irregular, se agregó 10 ml de agua destilada con el fin de diluir el cristal fino, se alimentó los cristales con ácido cítrico líquido por dos ocasiones con el fin de obtener cristales de un tamaño aceptable. Una vez obtenidos los cristales de ácido cítrico, estos se llevaron a un proceso de deshidratación para eliminar el exceso de humedad.

Los resultados obtenidos en esta investigación con la materia prima cachaza no fueron viables, ya que no es un medio de cultivo apto para el crecimiento de los microorganismos por su baja cantidad de carbohidratos, caso contrario sucedió con la materia prima melaza, con la cual los resultados fueron favorables. Luego de un análisis se determinó que el mejor tratamiento es el A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g de nitrato de amonio), con un rendimiento de 10,18 g/l; pureza de 97,38 % y un tiempo de fermentación de 186,67 horas.

SUMMARY

The goal of this work was to obtain citric acid from molasses or cachaza, through by fermentation using *Aspergillus niger* strain, ATCC 16888, this research generates an alternative to improve the use of these raw materials obtained from sugar industries and panela respectively.

This study consisted of three stages, which were: fermentation, purification and crystallization. In the fermentation stage temperature, aeration, pH, °Brix, stirring (rpm) were controlled; these parameters are critical in the development of the microorganism, the fermentation time depends on the components of each treatment. For the purification step the fermented liquid temperature was 50 °C, and then add calcium hydroxide 10 %, to a neutral pH ($7 \pm 0,5$) with which the calcium citrate was formed, which is separated by centrifugation, after several washings sulfuric acid was added at 10 %, which reacts with calcium citrate and precipitated as gypsum or calcium sulfate, thus allowing free citric acid which is in liquid form, which goes to the next crystallization step, wherein the citric acid liquid concentrated to 40 °Brix. The evaporator concentrate was removed and placed in a container to be carried in a Mary bathe, where it is worked at 38 ± 1 °C and constant stirring, 1 ml of the seed solution was added, after that a formation was observed the first crystals are irregularly sized, 10 ml of distilled water was added in order to dilute said fine crystal, liquid crystals with citric acid was fed twice in order to obtain an acceptable size crystals. Once obtaining the citric acid crystals, these were brought to a drying process to remove excess moisture.

The results obtained in this research with the raw material (cachaza) were not viable, since it is not a means of suitable cultivation for the growth of microorganisms by its low concentration of carbohydrates, otherwise happened with the raw material molasses, so which the results were favorable. After an analysis it was determined that the best treatment is the A1N1 (1 % inoculum and 0,2 g of ammonium nitrate), in a yield of 10,18 g/l; purity of 97,38 % and a fermentation time of 186,67 hours.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

Dentro de la producción de panela existen algunas operaciones, donde se derivan varios subproductos y/o desechos, una operación en particular y de nuestro interés es el denominado “descachazado” de donde se obtiene la cachaza.

En una publicación de Federación Nacional de Productores de Panela (2009), describe que “este subproducto desechado por la industria panelera es un líquido viscoso de color marrón oscuro que aún conserva altos contenidos de fibra, proteína y otros componentes” (p. 15). Por este motivo los productores paneleros lo utilizan como alimento de sus animales de carga, una gran cantidad de este subproducto no es aprovechado por dichos animales, quedando totalmente vertido y desperdiciado en el campo, otros lo depositan en ríos o fuentes de agua aledañas a la industria, pero, en cualquiera de los casos esto se convierte en un problema muy grave de contaminación ambiental debido a su gran contenido de materia orgánica, generándose problemas de salubridad y mortalidad de la fauna silvestre especialmente en los ríos y fuentes de agua.

Dentro de la industria azucarera se genera un subproducto de interés, el cual no posee una variada utilización industrial en el país, la melaza o miel de caña, que es un líquido, viscoso, residuo de la cristalización final del azúcar, que en la actualidad los ingenios azucareros lo utilizan para la elaboración artesanal de panela y alcohol, otras industrias lo utilizan como sustrato en la obtención de levaduras y en menor escala algunos ganaderos lo utilizan como un insumo en la elaboración de piensos para la alimentación de sus ganados.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación tuvo como fin establecer la mejor forma de producir ácido cítrico a nivel de laboratorio tomando como sustrato cachaza o melaza de caña, que son subproductos desechados por las industrias paneleras y azucareras respectivamente, y que tienen gran importancia por su contenido en azúcares, fibra, proteína y otros componentes, lo cual hace que sean un excelente medio de cultivo para fermentaciones industriales, de esta forma se está dando a conocer un nuevo método de utilización de estos subproductos.

Actualmente en Ecuador no existe producción de ácido cítrico a nivel industrial debido a la falta de tecnología y a una metodología concreta desarrollada para las condiciones que se presentan a nivel local.

Al obtener los datos del mejor método en la producción de ácido cítrico a nivel experimental (laboratorio), la comunidad en general está en condiciones de adaptarlo y llevarlo a un nivel industrial, con el fin de aprovechar y diversificar estos subproductos de las industrias panelera y azucarera, que bien se convertirían en una fuente de ingresos económicos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* ATCC16888.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ∅ Determinar el medio de cultivo adecuado en base a los nutrientes.
- ∅ Monitorear el pH en el proceso de la fermentación.
- ∅ Calcular el rendimiento final del ácido cítrico.
- ∅ Determinar la pureza del producto obtenido.
- ∅ Establecer curvas de crecimiento de los microorganismos vs concentración de nutriente.

1.4 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

1.4.1 HIPÓTESIS AFIRMATIVA

Los subproductos de la industria azucarera (cachaza o melaza) y la cantidad de nutriente, permiten obtener ácido cítrico.

1.4.2 HIPÓTESIS NULA

Los subproductos de la industria azucarera (cachaza o melaza) y la cantidad de nutriente, no permiten obtener ácido cítrico.

Capítulo II

MARCO TEÓRICO

2.1 AGROINDUSTRIA PANELERA EN EL ECUADOR



Fotografía 1. Presentación de panela en el sector
(Rosas & Terán, 2015)

De acuerdo a Freire y Landázuri (2011), afirman que en nuestro país la agroindustria panelera se encuentra diseminada a lo largo y ancho del territorio ecuatoriano y está dirigida por pequeños y grandes productores de caña. Se identifica por su producto tradicional la panela en bloque y granulada, las cuales se producen en un nivel tecnológico artesanal y tiene un alto consumo en todos los estratos sociales del país. Las Provincias más destacadas en esta actividad son: Imbabura, Bolívar, Pichincha (Santo Domingo, Nanegalito, Pacto, El Paraíso, etc.), Pastaza (Tarqui, Las Américas), Manabí, Guayas, Napo, Morona Santiago y otras en menor cantidad.

Es ampliamente reconocido el atraso del sector panelero en el Ecuador, considerado más, como una producción artesanal que técnica. La nula competencia que presentan los derivados de la agroindustria panelera en el mercado los mantiene en condiciones desfavorables frente a su principal competidor, el azúcar de mesa producida en los ingenios azucareros. La falta de tecnologías adecuadas para la producción, pocas investigaciones sobre nuevos usos, presentaciones y la ausencia de normas de calidad. (pp. 9-10).

En el año 2012, Espinoza y Pincay señalan que Ecuador exporta panela, especialmente a Europa, con partida arancelaria propia de código 1701111000 y bajo la denominación de CHANCACA, PANELA, RASPADURA. Según los datos del Banco Central del Ecuador, los principales compradores de panela, en orden de importancia y durante el periodo 2000-2007, son Italia, España y Alemania. (p. 16).

2.2 AGROINDUSTRIA PANELERA EN LA PROVINCIA DE IMBABURA

En su investigación Freire y Landázuri (2011), señalan que en la Provincia de Imbabura gran parte de la producción panelera proviene de pequeñas unidades productivas móviles que enfrentan problemas de ausencia de prácticas agroindustriales y comercialización de sus productos.

Las principales zonas productoras de panela en la Provincia de Imbabura se encuentran en los cantones de: Ibarra (Salinas, Ambuquí), Urcuquí (Santiago El Rey, Tumbabiro y Pablo Arenas), Cotacachi (Intag, García Moreno, Apuela y El Cristal) y Antonio Ante (Atuntaqui).

Las zonas de Intag, Urcuquí y los valles del Chota e Ibarra son zonas subtropicales donde los ingresos desde hace 30 años ha sido la producción de caña de azúcar que permite la existencia de la tradicional “molienda”, agroindustria casera productora de “panela” y abastecimiento a varios ingenios azucareros. (p. 11).

2.2.1 SUBPRODUCTOS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE PANELA

En el año 2011, Campués y Tarupí mencionan que durante el proceso de producción de panela se generan 2 subproductos de importancia, el bagacillo y la cachaza, el primero se retiene en los pre limpiadores y corresponde al bagazo de menor tamaño, la cachaza se genera en el proceso de clarificación o limpieza propiamente dicha de los guarapos de la caña, para éste se usan agentes floculantes de origen vegetal como las cortezas de balso, cadillo, guásimo, entre otras, los cuales con sus propiedades aglutinantes permiten extraer por medios físicos dicho subproducto.

El bagazo es uno de los principales subproductos de la agroindustria panelera, es eliminado durante la etapa de molienda en los trapiches y reutilizado como combustible. (p. 27).



Bagacillo



Cachaza

Fotografía 2. Subproductos de la industria panelera
(Rosas & Terán, 2015)

2.2.1.1 Cachaza

2.2.1.1.1 Definición

Federación Nacional de Productores de Panela (2009), cita que “físicamente la cachaza es un material esponjoso, amorfo, de color oscuro a negro, que absorbe grandes cantidades de agua. La cachaza generalmente es rica en fósforo, calcio, nitrógeno y pobre en potasio” (p. 10).

2.2.1.1.2 Obtención

La cachaza es un subproducto de la fabricación de panela que resulta de la limpieza del jugo por medio de la utilización de plantas como el cadillo balso blanco o guasito. Estas plantas hacen que sobre la superficie del jugo se forme una capa de naturaleza coloidal, la cachaza. (Federación Nacional de Productores de Panela, 2009).

2.2.1.1.3 Producción de cachaza

“Tanto la composición química de la cachaza como su volumen de producción varían de acuerdo al sitio y a las condiciones de producción de cada lugar” (Federación Nacional de Productores de Panela, 2009).

2.2.1.1.4 Composición química de la cachaza

Tabla 1. Componentes físicos – químicos de la cachaza

Elemento	Concentración
Materia Seca, %	26,16
Proteína, %	1,83
Fibra cruda, %	1,54
Extracto etéreo, %	1,18
Cenizas, %	1,53
ELN, %	19,08
Calcio, ppm	150,00
Fósforo (P ₂ O ₅), ppm	338,00
Hierro, ppm	35,75
° Brix	21,02
Sacarosa (Pol), %	17,09
Azúcares reductores, %	2,52

Fuente. (fedepanela.org.co, 2009)

2.2.1.1.5 Usos

Su utilización en la alimentación animal no ha sido racional debido a su fácil fermentación, su alto contenido de agua y a falta de investigación. Un método de conservación efectivo y práctico es someter este subproducto a deshidratación por calor, produciendo un material más estable y de fácil manejo denominado melote. (Sarria, Solano y Preston, 1990).

2.3 INDUSTRIA AZUCARERA EN EL ECUADOR



Figura 1. Presentaciones de azúcar

(Ingenio Azucarero del Norte, 2010)

El área de producción de caña de azúcar en Ecuador es de aproximadamente 110.000 has. de las cuales la mayoría se utiliza para la fabricación de azúcar y el resto para la elaboración artesanal de panela y alcohol. En el 2006 la superficie cosechada para producción de azúcar fue 69,156 ha, de las cuales el 89 % se concentra en la Cuenca Baja del Río Guayas (provincias de Guayas, Cañar y Los Ríos), donde están ubicados los ingenios de mayor producción: ECUDOS, San Carlos y Valdez. El 11 % restante corresponde a los ingenios IANCEM, en la provincia de Imbabura y Monterrey en la provincia de Loja.

El azúcar que se produce en Ecuador es básicamente para consumo nacional. A partir del 2005, los tres ingenios más grandes han iniciado programas de co-generación de energía eléctrica, para usar los residuos de bagazo de las fábricas. (Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador, 2013).

2.4 INDUSTRIA AZUCARERA EN LA PROVINCIA DE IMBABURA

2.4.1 INGENIO SAN JOSÉ

A tan solo cinco minutos de la ciudad de Urcuquí, con dirección sur este, se encuentra la Hacienda San José reconocida como Patrimonio Cultural de la Nación por haber sido emporio de desarrollo económico-productivo en tiempos de la Colonia.

Sin lugar a duda esta hacienda forma parte del patrimonio arqueológico del cantón Urcuquí, en este lugar existió el primer Ingenio Azucarero de la provincia, de allí es que el ingenio llevaba el mismo nombre. Hoy después de haber sido un importante generador de fuentes de trabajo para los habitantes, hoy permanece guardando en sus pasillos y patios un legado de lo que fue una de las más modernas tecnologías en el año en aquellas épocas.

En el Siglo XX, la hacienda y su poderío, fue propiedad de don Jacinto Jijón y Caamaño, quien la convirtió en una de las propiedades privadas más exitosas de Imbabura. La producción de caña fue dependencia de los padres Jesuitas produciendo la panela y el aguardiente. (<http://www.municipiourcuqui.gob.ec/>, 2015).

2.4.2 INGENIO AZUCARERO DEL NORTE

Según Explored (2011), publicaron que la historia del Ingenio como tal data de 1964, cuando la caja de previsión social decide instalar un Ingenio Azucarero en la zona, para la cual contrata a la compañía Fives Lille Cail y Granda Centeno.

Una vez terminada la obra en 1966, el Ingenio del Norte fue vendido a la compañía Taina, a la que en 1977, se le embarga, debido a que no pudo cumplir con los compromisos adquiridos con el IESS y la planta pasa a manos de depositarios judiciales. Ya para 1998, pasa a ser la Empresa de Economía Mixta Ingenio Azucarero del Norte, constituido con el aporte del IESS, cañicultores de Imbabura y Carchi, accionistas privados y trabajadores de la compañía, que en total pasan a ser 862.

El ingenio de Imbabura está ubicado en Tababuela, Panamericana Norte, en el kilómetro 25 de la vía a Tulcán. Entre los derivados que tiene el Ingenio Azucarero del Norte están el producto Azúcar Tababuela, melaza, compost, bagazo y cachaza. (párr. 7-10-12-13).

2.4.3 SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AZUCARERA

☞ **Bagazo**

Es el remanente de la fibra de la caña y constituye cerca del 30 % del total de la caña de azúcar procesada. Además, contiene aproximadamente 50 % de humedad. El bagazo se utiliza como combustible en los ingenios, supliendo hasta el 100 % de los requerimientos de combustible para las calderas. También, se utiliza para la producción de pulpa y papel. Del residuo fibroso pobre en sacarosa (bagazo) se origina una cantidad de 25 a 30 kg por cada 100 kg de caña.

☞ **Melaza**

Es el principal subproducto del procesamiento de azúcar, que constituye un 4.85 % de la caña. Se puede utilizar como endulzante, alimento para ganado y para producir alcohol industrial.

☞ **Cachaza**

Los precipitados sólidos se recolectan en filtros al vacío o filtros prensa después de los procesos de clarificación. La cachaza obtenida se utiliza principalmente como fertilizante debido a su contenido de fósforo, calcio, nitrógeno y en menos proporción, de potasio. Además, contiene más del cincuenta por ciento de materia orgánica. A menudo se utiliza para rellenar tierras bajas. Su disponibilidad es del 3 al 4 % del peso de la caña. (Centro Nacional de Producción más Limpia de Honduras, 2009).

2.4.3.1 Melaza

2.4.3.1.1 Definición

Es un producto líquido derivado de la caña de azúcar. Su aspecto es similar al de la miel aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, ligeramente similar al del regaliz.

Rico en hidratos de carbono, vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo. (Ingenio Azucarero del Norte, 2015).

2.4.3.1.2 Obtención

En su libro Quezada (2007), describe que la masa cocida se separa de la miel por medio de centrífugas, obteniéndose azúcar crudo o mascabado, miel de segunda o sacarosa líquida y una purga de segunda o melaza. El azúcar moscabado debe su color café claro al contenido de sacarosa que aún tiene.

Las melazas se emplean como una fuente de carbohidratos para el ganado (cada vez menos), para ácido cítrico y otras fermentaciones. (p. 217).

2.4.3.1.3 Producción de melaza

“En los Ingenios azucareros se obtienen entre 29 y 41,6 litros de melaza/Ton de caña (7,6 Gal. /Ton) dependiendo del °Brix final de la melaza”. (Gilces Farías & Veloz Pinto, 2006).

2.4.3.1.4 Composición química de la melaza

Tabla 2. Componentes físicos – químicos de la melaza

Componente	Cantidad
Brix	80
Pol	38,9
Pureza	49,37
Calcio	854 mg/100g
Manganeso	0,7 mg/100g
Hierro	7,8 mg/100g
Sodio	22,7 mg/100g

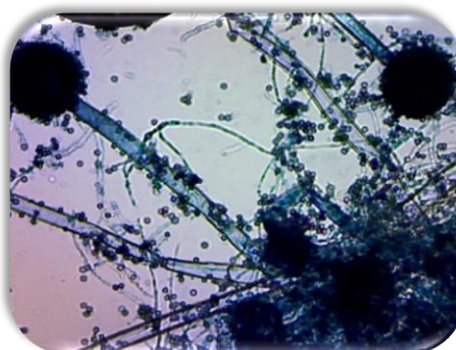
Fuente. (Ingenio Azucarero del Norte, 2010)

2.4.3.1.5 Usos

Jordá (2011), menciona que las melazas son siempre un buen laxante natural. También se las conoce como sirope o jarabe.

Sus usos son muy diversos, incluyendo la fabricación de piensos, insecticidas, o la destilación del ron, o del vinagre de caña, o remolacha. (p. 718).

2.5 *Aspergillus niger*



Fotografía 3. *Aspergillus niger* visto al microscopio

(Rosas & Terán, 2015)

2.5.1 DESCRIPCIÓN

De acuerdo a Duque (2008), *Aspergillus* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas.

Aspergillus niger tiene el micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, conidióforos largos y lisos y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula.

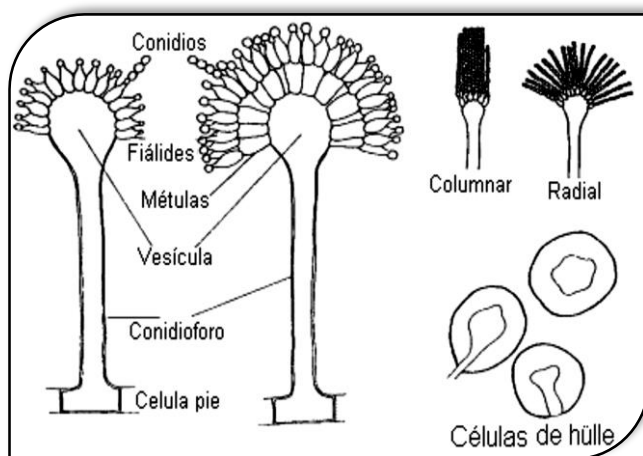


Figura 2. Morfología del género *Aspergillus*

(Duque, 2008)

Es un hongo que produce un moho negro en vegetales muy común en la lechuga, el tomate y la acelga. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus* cultivada para la producción de: ácido cítrico, ácido glucónico enzimas: glucoamilasa, galactosidasa, etc.

Aspergillus niger crece rápidamente en una variedad de sustratos artificiales produciendo colonias que consisten de un fieltro basal blanco o amarillo cubierto por una capa densa de conidios de color castaño oscuro a negro. Las conidioesporas de esta especie son típicamente

de 900 - 1600 μm de longitud, paredes lisas y termina en las vesículas globosas color café pálido de 40 - 60 μm de diámetro. (pp. 24-26-30).

2.5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Tabla 3. Taxonomía de *Aspergillus niger*

ESPECIE	<i>Aspergillus niger</i>
GÉNERO	<i>Aspergillus</i>
FAMILIA	Trichomaceae
ORDEN	Eurotiales
REINO	Fungi

Fuente. (White, 2010)

2.5.3 ASPECTOS NUTRICIONALES

En su libro García, Quintero y López (2004), mencionan que en general la cantidad de ácido cítrico está en relación inversa con el crecimiento celular. Al inicio de la fermentación, sin embargo, se requiere un balance apropiado de nutrientes que permita la propagación adecuada del micelio. Los factores nutricionales más importantes para una producción exitosa son la concentración y tipo de carbohidratos y el contenido de metales. Los carbohidratos deben ser simples y de fácil transportación a través de la membrana, gracias a la presencia de invertasas extracelulares asociadas a la membrana. Estas hidrolasas desdoblan la sacarosa a hexosas y son sumamente activas a las condiciones de fermentación. Gracias a ello el medio industrial más usado son las melazas, tanto de caña como de remolacha. Estas últimas son en ocasiones preferidas por presentar un mayor contenido de nitrógeno. Se requiere una concentración particularmente alta en azúcares entre 140 - 240 g/l.

La fuente de nitrógeno debe ser baja del orden de 0,1 – 0,4 g/l y proporcionado preferentemente por sales de amonio como sulfato o nitrato. Se ha reportado que un consumo total del nitrógeno en el medio es prerrequisito para el inicio de la acumulación de ácido cítrico. En ocasiones, el contenido de nitrógeno puede ser alto en tanto el fosfato se mantenga

bajo. El fosfato juega un papel regulador importante de reacciones metabólicas. El contenido recomendado se encuentra entre 0,1 y 0,2 %. Concentraciones mayores promueven el crecimiento vegetativo a costa del rendimiento en ácido cítrico.

La presencia de metales en el medio de cultivo es indispensable para el crecimiento celular. Estos niveles se encuentran a nivel de unas cuantas ppm. Sin embargo, niveles ligeramente superiores afectan el rendimiento de cítrico dramáticamente. El Contenido de metales es crítico pues medios optimizados en fuentes de C, N y P no promueven la producción de cítrico si los metales no están ajustados adecuadamente. (pp. 560-561).

2.5.4 REQUERIMIENTOS DE FERMENTACIÓN

La fermentación se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente 30 °C. Se produce calor y se requiere algún grado de refrigeración.

Cuando se utiliza *A. niger* el pH inicial depende del medio empleado. Con medio con melazas, el pH inicial debe ser neutro o ligeramente ácido para que se produzca la germinación y el crecimiento. Cuando el medio está basado en glucosa o sacarosa relativamente puras y sales inorgánicas, el pH inicial puede estar en el rango de 2,5 – 3,5. El pH desciende durante la fermentación, con un pH final frecuentemente de 2,0; cuando se utilizan levaduras el pH frecuentemente es controlado cerca de la neutralidad por adicción de cal, carbonato sódico o hidróxido sódico. García et al. (2004).

2.6 ÁCIDO CÍTRICO



Fotografía 4. Ácido cítrico
(Rosas & Terán, 2015)

2.6.1 DEFINICIÓN

El ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) es un acidulante ampliamente usado, inocuo con el medio ambiente. Es prácticamente inodoro, de sabor ácido no desagradable, soluble en agua, éter y etanol a temperatura ambiente.

Es un sólido incoloro, traslúcido o blanco, que se presenta en forma de cristales, granular o polvo. Es anhidro o contiene una molécula de agua de hidratación.

Químicamente, el ácido cítrico comparte las características de otros ácidos carboxílicos. Cuando se calienta a más de $175\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descompone produciendo dióxido de carbono y agua (MAKYMAT, 2009).

2.6.2 ANTECEDENTES

En el año 2009, Chang menciona que desde 1784 Scheele logró aislar ácido cítrico a partir del jugo de limón. En 1860 comenzó a obtenerse el ácido cítrico de las frutas mediante el uso de sales de calcio. Este proceso tiene un rendimiento muy bajo, son necesarias de 30 a 40 toneladas de limones para obtener una tonelada de ácido cítrico. Tres décadas después se observó que algunos hongos producen ácido cítrico cuando crecen en un medio azucarado.

En 1880 la compañía Pfizer, fundada por los hermanos alemanes Charles Pfizer y Charles Erhart, comenzaron a fabricar ácido cítrico, utilizado por varias industrias de ese tiempo.

Desde 1920 en adelante fueron desarrollados con éxito procesos de fermentación, en los que se utilizan generalmente cepas del hongo *Aspergillus niger*, aunque también han sido empleadas ciertas cepas de levaduras.

Hoy la producción comercial de ácido cítrico se realiza sobre todo por procesos de fermentación que utilizan dextrosa o melaza de caña de azúcar como materia prima y *Aspergillus niger* como organismo de fermentación. (p. 23).

2.6.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y RENDIMIENTO

En su artículo Delta Enfoque (2009), menciona que el ácido cítrico es producido mediante fermentación, que puede llevarse a cabo en tanques profundos (fermentación sumergida, que es el método más común) o en tanques no profundos (fermentación de superficie) usando carbohidratos naturales, tales como azúcar y dextrosa como sustratos, y *Aspergillus niger* como organismo de fermentación. El proceso de obtención tiene varias fases como la preparación del sustrato, la fermentación aeróbica de la sacarosa por el *Aspergillus*, la separación del ácido cítrico del sustrato por precipitación al añadir hidróxido de calcio o cal apagada para formar citrato de calcio. Después se añade ácido sulfúrico para descomponer el citrato de calcio. La eliminación de impurezas se realiza con carbón activado o resinas de intercambio iónico, se continúa con la cristalización del ácido cítrico, el secado o deshidratación y el empaquetado del producto. (párr. 3).

“La mayor producción de ácido cítrico por *A. niger* O - 5 correspondió al inóculo de esporas con 112 h de incubación (10 g/L)”. (Abín, Coto, Marrero, B., Marrero, J., 2004).

En su investigación Velásquez, Beltrán, Padilla & Giraldo (2010), encontraron que se obtuvo ácido cítrico a partir de sustrato de pulpa de plátano Dominic Hartón en estado maduro, empleando la cepa del hongo *Aspergillus niger* (donada por la universidad EAFIT). Se utilizó un inóculo al 5 % de suspensión de esporas (concentración aproximada de 1.0×10^7

esporas/ml) para proceso de fermentación por lotes, se utilizó un volumen de 2 litros de sustrato de plátano al cual se le ajustaron el pH y la concentración de azúcares reductores, para alcanzar el mejor rendimiento en la obtención de ácido. En la evaluación de la eficiencia de producción se obtuvieron 13,5 g/l de ácido cítrico.

Sánchez, Ortiz, & Betancourt (2004), encontraron que los resultados obtenidos para el hongo *Aspergillus niger* NRRL 3 muestran que las mayores concentraciones de ácido cítrico obtenidas corresponden al suero desproteinizado, hidrolizado y evaporado, con un promedio para el tratamiento de 5,77 g/l. Lo anterior indica que conforme aumenta la concentración de sustrato de tratamiento en tratamiento, aumenta también la cantidad de ácido cítrico producida.

2.6.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Tabla 4. Características del ácido cítrico

Fórmula	C ₆ H ₈ O ₇
Peso molecular	192,13
Apariencia	cristales blancos
Sabor	sabor ácido
Olor	prácticamente sin olor
Solubilidad (gr./100 ml a 25°C)	en agua: 162
	en etanol: 59
	en éter: 0,75
Punto de fusión	153 °C

Fuente. (Bristhar Laboratorios C.A., 2010)

2.6.4.1 Pureza

McCabe, Smith y Harriott (2007), definen que un cristal sólido, bien formado por sí solo es casi puro, pero retiene líquido madre cuando se ha eliminado a partir del magma final, y si la cosecha contiene agregados cristalinos, es posible ocluir cantidades considerables de líquido madre dentro de la masa del sólido. Cuando el líquido madre de baja pureza retenido

se seca sobre el producto, existe contaminación, cuya intensidad depende de la cantidad y el grado de impurezas del líquido madre retenido por los cristales.

En la práctica, la mayor parte del líquido madre es separado de los cristales por filtración o centrifugación, y el balance se elimina por lavado con solventes frescos. Las efectividades de estos pasos de purificación dependen del tamaño y uniformidad de los cristales.

2.6.5 PRINCIPALES USOS

Según Bristhar Laboratorios C.A. (2010), los principales usos del ácido cítrico son:

➤ **Bebidas**

Saborizante y regulador del pH; incrementa la efectividad de los conservantes antimicrobianos.

➤ **Dulces y Conservas**

Acidulante y regulador del pH para lograr una óptima gelificación.

➤ **Verduras Procesadas**

En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación.

➤ **Alimentos Congelados**

Ayuda a la acción de los antioxidantes; inactiva enzimas previniendo pardeamientos indeseables; inhibe el deterioro del sabor y el color.

➤ **Frutas y Hortalizas Enlatadas**

Disminuye el pH; previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.

➤ **Aceites y Grasas**

Previene la oxidación.

➤ **Confitería y Repostería**

Se utiliza como acidulante, resaltador de sabores y para optimizar las características de los geles.

➤ **Quesos Pasteurizados y Procesados**

En forma de sal, como emulsificante y texturizante.

➤ **Lácteos**

Estabilizante en cremas batidas.

➤ **Carnes**

Se utiliza como auxiliar del procesado y modificador de textura.

2.7 CRISTALIZACIÓN

Romero & Rodríguez (2014), mencionan que la técnica de cristalización consiste en separar un sólido (solute) disuelto en un líquido (solvente) mediante evaporación, para obtener el soluto en forma de cristales. El procedimiento consiste en evaporar parte del solvente aplicando calor a la mezcla inicial para posteriormente enfriar la solución hasta que uno de sus componentes alcanza el punto de saturación a esa temperatura, lo que obliga al soluto a cristalizar. La cristalización ocurre de tal manera que solo incorpora moléculas del mismo compuesto, dejando las impurezas en solución. (p. 12).

McCabe, Smith & Harriott (2007), afirman que “la cristalización industrial de una solución, la mezcla bifásica formada por los líquidos madres y los cristales de todos los tamaños, contenida en un cristalizador y que se saca como producto, recibe el nombre de *magma*”.

2.7.1 PROCESOS DE CRISTALIZACIÓN MÁS COMUNES

2.7.1.1 Fabricación del grano por el método antiguo

En el año 1967, Meade indica que la viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura, se logra más exactitud en su determinación si se lleva a cabo este proceso al mismo vacío. La muestra se toma entre el índice y el pulgar, se separan estos dedos, y se observa el largo que llega el cordón de jarabe antes de quebrarse. No comenzará a formarse grano con el método antiguo hasta que este cordón sea más largo que la separación que se puede lograr entre el índice y el pulgar de la mano. Con jarabe de 83 de pureza y control por instrumentos, el grano se formará a un a.p.e. de aproximadamente 27°, o una sobresaturación de 1,75 en la zona lábil, en la cual se forman cristales espontáneamente sin que haya otros presentes.

Llegado este punto, el grano comenzará a formarse rápidamente, y la cantidad deseada se determina de acuerdo con el criterio de un puntista o tachero muy experimentado, quien se basa en la observación de una muestra esparcida sobre un pedazo de vidrio y examinada con lupa o microscopio. Cuando se ha formado suficiente grano, se frena la formación, aplicando alimentación al tacho y disminuyendo el vacío 3 o 4". Con el control manual, el sentido del tacto y la apariencia que tiene la muestra tomada con la sonda determinan el progreso de la formación del grano. El objetivo es el regreso de la fase metastable, en la cual se desarrollan los cristales existentes, pero no se forman cristales nuevos. Si existen instrumentos, se puede lograr precisión. El a.p.e. se baja a aproximadamente 19°, lo que corresponde a una sobresaturación de 1,25.

2.7.1.2 El semillamiento por choque

El semillamiento por choque fue introducido por Zitkowski en la industria remolachera, sustituyó rápidamente el método más antiguo que consistía en permitir que el grano se formara espontáneamente. El líquido se concentra hasta un punto superior al de saturación, después de lo cual se introduce al tacho una cantidad pequeña (aproximadamente ½ kg) de polvo de azúcar. Este polvo no sirve de núcleo al grano, sino constituye un choque a la

solución sobresaturada, mediante el cual se induce la formación del grano nuevo más pronto que con el procedimiento antiguo. El choque se debe aplicar tan pronto como se haya pasado el punto de saturación, lo que significa que se debe hacer cuando la solución este en la zona metastable.

Con el control manual, el momento de aplicar el choque se determina por el largo del cordón de una muestra que se toma entre el índice y el pulgar: cuando dicha muestra tenga cordón de 1" de largo aproximadamente, el momento de hacer el choque ha llegado. Con control por instrumentos, el polvo se debe inyectar cuando apenas se haya pasado el punto de saturación; esto corresponde a un a.p.e. de 16, o sobresaturación de 1,10 con 83° de pureza.

No aparecerá grano tan pronto como se introduzca el azúcar pulverizado. Junto con el choque se admite una cantidad mínima de aire, para evitar alteraciones del equilibrio de temperatura. Cuando, después de algunos minutos, comience a formarse el grano, habrá que decidir cuándo detener dicha formación, lo que se hará por examen de la muestra tomada por sonda, como en el procedimiento antiguo.

El grano se debe haber terminado de formar estando el a.p.e. a un nivel de aproximadamente 19 (sobresaturación de aproximadamente 1,40), de modo que no será grande el cambio producido al volver a la zona metastable. Parece que es mejor ejecutar este cambio mediante alimentación de jarabe, y dejar que el vacío permanezca inalterado.

Hasta que el grano haya quedado completamente desarrollado, la sobresaturación no debe ser muy alta. De otra forma, se producirá conglomeración, aun antes de que ocurra la formación de falso grano, y si esto pasa no se podrá hacer nada más que volver a fundir el azúcar.

2.7.1.3 El semillamiento de tachos

El sistema mejor para lograr una buena formación de grano es el de <<semillamiento total>> del tacho, que significa la inyección, en el momento debido, de la cantidad plena de grano de tamaño predeterminado, en equivalente al número total de cristales que se desea que

contenga la templa terminada. No se forman cristales en el tacho en ningún momento, y hay que mantener la concentración de la zona metastable o de crecimiento de cristales. La semilla se introduce tan pronto como los instrumentos indican que se ha llegado al punto de saturación. Para determinar la cantidad correcta de cristales finos de determinado tamaño que hay que introducir al tacho para formar una templa de cristales de azúcar de cierto tamaño, se procede como sigue:

- a) Determinése el peso del azúcar que se espera obtener de la templa.
- b) Cuéntese unos 500 cristales de azúcar de este tipo, y determinése su peso.
- c) Cuéntese el mismo número de cristales del polvo de semilla que se va a utilizar.
- d) La división de c) por b), y multiplicación del cociente por a) indica el peso de semilla que hay que utilizar.

Después de esto ha quedado determinado y probado, se pueden efectuar correcciones menores para compensar las variaciones que puedan existir. Una vez que se haya establecido el procedimiento, la fijación de normas eliminará el factor personal, y la operación podrá ser duplicada por cualquiera.

Este método de semillamiento de tachos está en uso universal en la actualidad en las refinerías para la producción de azúcares de granos grandes tales como los tipos <<sanding>>, <<manufacturer's standard>>, <<médium>> y <<coarse>>. Utilizando semilla de tamaño y cantidad correcta el grano, estos azúcares especiales se pueden producir en cristales mucho más uniformes, y completamente libres de conglomerados, lo que es casi imposible lograr con otros métodos.

Ya hemos mencionado que el momento correcto para sembrar es cuando se acaba de pasar el punto de saturación. Con 83 de pureza y una temperatura de templa de 150 °F, el a.p.e. al punto de saturación es de 14,5 °F. Si se deja un margen de 1,5, el punto de semillamiento correcto es el de a.p.e. 16, al cual la sobresaturación es de 1,10. Para lograr esta determinación por el método manual, se pone un grano de azúcar gruesa en la socavación de la sonda, se permite que la sonda entre en el tacho para que el azúcar quede mojada de la meladura en cocción, y se extrae la sonda. Si la lupa muestra que los cristales del azúcar

introducido están redondeados, no se ha llegado aún al punto de saturación. Si las aristas siguen estando cuadradas y afiladas, el punto de saturación ha sido sobrepasado, y se puede proceder al semillamiento o choque. El saturascopio también se puede usar para esta determinación. (pp. 216 - 219).

2.7.2 IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE LOS CRISTALES

No cabe duda que una buena producción y una elevada pureza son dos objetivos importantes de la cristalización, pero el aspecto y el intervalo de tamaños del producto cristalino también es importante. Si los cristales van a ser posteriormente procesados, por filtración, lavado, reacción con otros productos químicos, transporte y almacenamiento, es deseable que su tamaño sea adecuado y uniforme. Si los cristales se comercializan como un producto acabado, la aceptación por los consumidores exige cristales individuales resistentes de tamaño uniforme, que no formen agregados y que no se aglomeren en el envase. Por estas razones es preciso controlar la *distribución del tamaño de los cristales*, este es uno de los principales objetivos que se tiene en cuenta en el diseño y operación de cristalizadores. (pp. 971-972).

2.8 CURVAS DE CRECIMIENTO DE UN MICROORGANISMO

En el año 2003, Hernández describe que esta curva representa el comportamiento del crecimiento del microorganismo a través del tiempo. Con base en ella, se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos (primarios o secundarios). En la figura 3 se muestran las diferentes fases de crecimiento de un microorganismo.

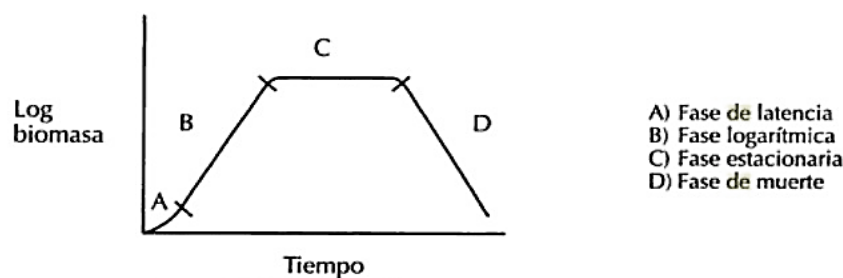


Figura 3. La curva de crecimiento de un microorganismo

(Hernandez, A., 2003)

2.8.1 LA FASE DE LATENCIA

La fase de latencia también es conocida como *fase lag*; coincide con el período de adaptación del microorganismo a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. Se presenta inmediatamente después de la inoculación y su duración depende del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Si el microorganismo se encuentra en su fase logarítmica antes de la inoculación, la fase lag es muy pequeña o puede no presentarse. Durante este período, no existe aumento en el número de células, pues el microorganismo utiliza la energía disponible con el fin de sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en su nuevo medio.

2.8.2 LA FASE LOGARÍTMICA O EXPONENCIAL

En la fase logarítmica, las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (para levaduras y bacterias) o por el aumento de biomasa por unidad de tiempo (para hongos filamentosos). La velocidad de crecimiento durante este período permanece constante y es independiente de la concentración del sustrato, siempre y cuando esta sustancia se encuentre en exceso.

La fase logarítmica termina cuando se produce alguna de estas tres situaciones: los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales indispensables para la célula se modifican o cuando la célula produce metabolitos tóxicos o que inhiben su reproducción.

2.8.3 LA FASE ESTACIONARIA

En la fase estacionaria, la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo es igual a la velocidad de muerte y se llega a un equilibrio celular. La importancia de esta fase varía con el tipo de fermentación. Si el objetivo final de la fermentación es producción de etanol, no es necesario (ni rentable) continuar el proceso cuando se alcanza la fase estacionaria, ya que una vez que obtiene la máxima concentración de las células, la

producción de etanol disminuye. Por el contrario, en la producción de antibióticos, la mayor acumulación de estas sustancias se presenta durante la fase estacionaria.

2.8.4 LA FASE DE MUERTE

La fase de muerte se inicia cuando los nutrientes que están en el medio de cultivo no son suficientes para que el microorganismo pueda reproducirse. Otro de los motivos por los cuales empieza esta etapa es la producción, como parte del metabolito, de sustancias tóxicas que impiden la multiplicación de las células. (pp. 47-48).

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAS PRIMAS E INSUMOS

3.1.1.1 Materias primas

- ∅ Cachaza
- ∅ Melaza

3.1.1.2 Insumos

- ∅ Ácido sulfúrico H_2SO_4 (10 %)
- ∅ Hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (10 %)
- ∅ Fuente nitrogenada; Nitrato de amonio NH_4NO_3
- ∅ Cepa de *Aspergillus niger*
- ∅ Ácido fosfórico H_3PO_4
- ∅ Fenolftaleína
- ∅ Desinfectante líquido (sablón)
- ∅ Alcohol industrial
- ∅ Cloro
- ∅ Algodón
- ∅ Papel aluminio
- ∅ Agua destilada

3.1.2 EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO

3.1.2.1 Equipos

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| ⌘ Biorreactor | ⌘ Potenciómetro |
| ⌘ Balanza gramera digital | ⌘ Brixómetro |
| ⌘ Autoclave | ⌘ Centrifuga |
| ⌘ Cocina eléctrica | ⌘ Deshidratador |
| ⌘ Estufas | ⌘ Microscópico |
| ⌘ Plancha agitadora | ⌘ Termómetro |
| ⌘ Baño maría | |

3.1.2.2 Materiales de laboratorio

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| ⌘ Cajas Petri | ⌘ Embudo |
| ⌘ Tubos de ensayo | ⌘ Atomizador |
| ⌘ Mechero de bunsen | ⌘ Goteros |
| ⌘ Gradilla | ⌘ Barrillas de agitación |
| ⌘ Aza metálica | ⌘ Papel filtro |
| ⌘ Vasos de precipitación | ⌘ Porta objetos |
| ⌘ Erlenmeyer | ⌘ Cubre objetos |
| ⌘ Probeta | |
| ⌘ Pipetas | |
| ⌘ Piseta | |
| ⌘ Barra de agitación | |
| ⌘ Soporte universal | |
| ⌘ Pinza doble nuez | |
| ⌘ Bureta | |
| ⌘ Tubos de centrifuga | |
| ⌘ Recipientes | |
| ⌘ Cucharas | |

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en dos sectores: la primera fase en la parroquia San Francisco, en las calles Río Chambo 3-55 entre Río Amazonas y Río Blanco y la segunda fase en la parroquia El Sagrario, en la Av. 17 de Julio 5-21 – Ciudadela Universitaria, en los laboratorios de análisis físicos – químicos y microbiológicos de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

Tabla 5. Ubicación y datos meteorológicos del experimento

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Latitud geográfica	00° 19' 47" N
Longitud geográfica	78° 07' 56" W
Altitud	2256 msnm
Temperatura Media (°C)	17,7
Mx. Absoluta (°C)	32,8
Mn. Absoluta (°C)	1,4
Humedad relativa del aire media (%)	72

Fuente. (INAMHI, 2015)

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con arreglo factorial AxBxC, en donde A corresponde al porcentaje de inóculo, B a la cantidad de nutriente y C a las materias primas.

3.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO

Número de repeticiones:	Tres (3)
Número de tratamientos:	Ocho (8)
Número de unidades experimentales:	Veinte y cuatro (24)

3.2.4 UNIDAD EXPERIMENTAL

Cada unidad experimental estuvo conformada por 3 litros de materia prima.

3.2.5 ESQUEMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 6. ADEVA

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.
Total	23
Repeticiones	2
Tratamientos	7
Factor A	1
Factor B	1
Factor C	1
Factor A x B	1
Factor A x C	1
Factor B x C	1
Factor A x B x C	1
Error Experimental	14

3.2.6 ANÁLISIS FUNCIONAL

Se calculó el coeficiente de variación (CV), prueba de Tukey al 5 y 1% para tratamientos y la diferencia mínima significativa (DMS) para factores.

3.2.7 FACTORES EN ESTUDIO

Tabla 7. Descripción de Factores

FACTOR A Porcentaje de inóculo de <i>Aspergillus niger</i>	A1 = 1 %	A2 = 1,5 %
FACTOR B Cantidad de nutriente	N1 = 0,2 g de amoníaco / l	N2 = 0,4 g de amoníaco / l
FACTOR C Materias primas	M1 = Cachaza panelera	M2 = Melaza azucarera

3.2.8 TRATAMIENTOS

De la combinación de los factores AxBxC se obtuvo los siguientes tratamientos en estudio.

Tabla 8. Descripción de Tratamientos

Tratamientos	% de inóculo	Cantidad de nutriente	Materias primas	Combinaciones
T1	A1	N1	M1	A1N1M1
T2			M2	A1N1M2
T3		N2	M1	A1N2M1
T4			M2	A1N2M2
T5	A2	N1	M1	A2N1M1
T6			M2	A2N1M2
T7		N2	M1	A2N2M1
T8			M2	A2N2M2

3.2.9 VARIABLES A EVALUARSE

- ∅ pH.
- ∅ Rendimiento de ácido cítrico.
- ∅ Pureza del producto terminado.
- ∅ Humedad del producto terminado.
- ∅ Tiempo de fermentación.

3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

3.3.1 REPRODUCCIÓN DE LA CEPA

La cepa del microorganismo *Aspergillus niger* se recibió del centro estadounidense de recursos biológicos privados ATCC (American Type Culture Collection), la cual fue reproducida conforme a los requerimientos descritos en la ficha técnica adjunta al microorganismo, para ello se preparó un medio de cultivo PDA (Patata Dextrosa Agar) en el que se sembró la cepa de *Aspergillus niger*, esto se incubó a temperatura de 28 ± 1 °C por un tiempo de 72 horas.



3.3.2 ETAPA DE FERMENTACIÓN

Para esta etapa se utilizó un biorreactor el cual consta de: un frasco de fermentación de doble camisa de vidrio con una capacidad de trabajo de 3 litros, dentro del cual se encuentra un agitador de aspas accionado por un rotor conectado a un regulador de velocidad de rotación

(rpm), un dispositivo de aireación que se conecta a una de las válvulas de entrada del equipo, el equipo además cuenta con un sistema de recirculación de agua para el control de temperatura, que puede ser regulado a la disposición que se requiera, adicional a esto, se dispone de un potenciómetro el cual consta de dos sondas encargadas de la medición de pH y temperatura.

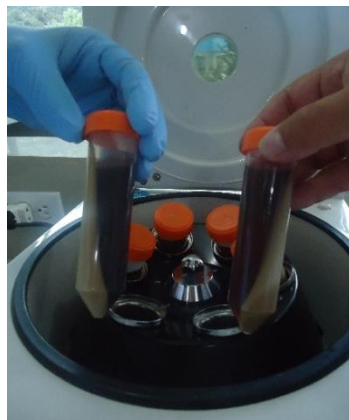
Para la fermentación se preparó una solución que actuará como sustrato para el desarrollo del microorganismo, que constó de 900 ml de melaza y 2100 ml de agua destilada, se acidificó con ácido fosfórico hasta llegar a un pH entre 3,5 – 4,5 y se agregó nitrato de amonio como nutriente según indica cada tratamiento, esto se esterilizó en el autoclave a 121 °C, 1 atm, 15 min, una vez enfriado se colocó en el fermentador previamente esterilizado. Se realizó un raspado de esporas de acuerdo a la cantidad planteada para cada tratamiento, esto se inoculó en la solución sustrato y se inició la fermentación en las siguientes condiciones: temperatura de 28 °C, 200 rpm, aireación, por un tiempo ≥ 6 días. La toma de datos se realizó cada 8 horas durante toda la etapa de fermentación.



3.3.3 ETAPA DE PURIFICACIÓN

Una vez concluida la fermentación se obtuvo un caldo fermentado al que se llevó a temperatura de 50 °C para ser añadido hidróxido de calcio al 10 % hasta llegar a un pH neutro, esto lleva a la formación de citrato cálcico el cual es sólido y se precipita al momento de colocarlo en la centrífuga a 6000 rpm por un tiempo de 6 minutos, posteriormente se realizó varios lavados con agua destilada a temperatura de 40 °C con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas. Inmediatamente a este citrato se añadió ácido sulfúrico al

10 % en la misma cantidad de hidróxido de calcio más un 5 % extra para asegurarnos que todo el citrato cálcico reaccione y se precipite en forma de yeso o sulfato cálcico, esto se llevó a la centrifuga, permitiendo así liberar el ácido cítrico que se encuentra en forma líquida, del yeso que se encuentra en forma sólida, la centrífuga trabajó a 6000 rpm por un tiempo de 6 minutos.



3.3.4 ETAPA DE CRISTALIZACIÓN

El ácido cítrico líquido se llevó a evaporación, dejando 20 ml de este para ser utilizado más adelante en el proceso, en el evaporador se controló la temperatura, que debe ser de 38 ± 1 °C, este proceso toma alrededor de 4 horas dependiendo de la cantidad de agua que contenga, se evaporó hasta llegar a una concentración ≥ 40 °Brix. Paralelo a este proceso se preparó una solución semilla, tomando 1 g de ácido cítrico comercial en 100 ml de alcohol. A continuación se retiró el concentrado del evaporador y se colocó en un recipiente a baño maría, manteniendo la temperatura a 38 ± 1 °C y con agitación constante, en donde se agregó 1 ml de la solución semilla. En estas condiciones se va concentrando esta miel y a la vez formándose los primeros cristales donde se observa gran cantidad de estos, entre finos y gruesos, se agregó 10 ml de agua destilada con el fin de diluir el cristal fino y que este diluido se una al resto para formar cristales de mayor tamaño mediante concentración en las mismas condiciones que se está trabajando, con el propósito de obtener un cristal uniforme y de buen tamaño se alimenta con 10 ml de ácido cítrico líquido y se continua concentrando, esta alimentación se la realizó por una ocasiones más, para lo cual se continua trabajando en las mismas condiciones de temperatura, hasta obtener los cristales definitivos.

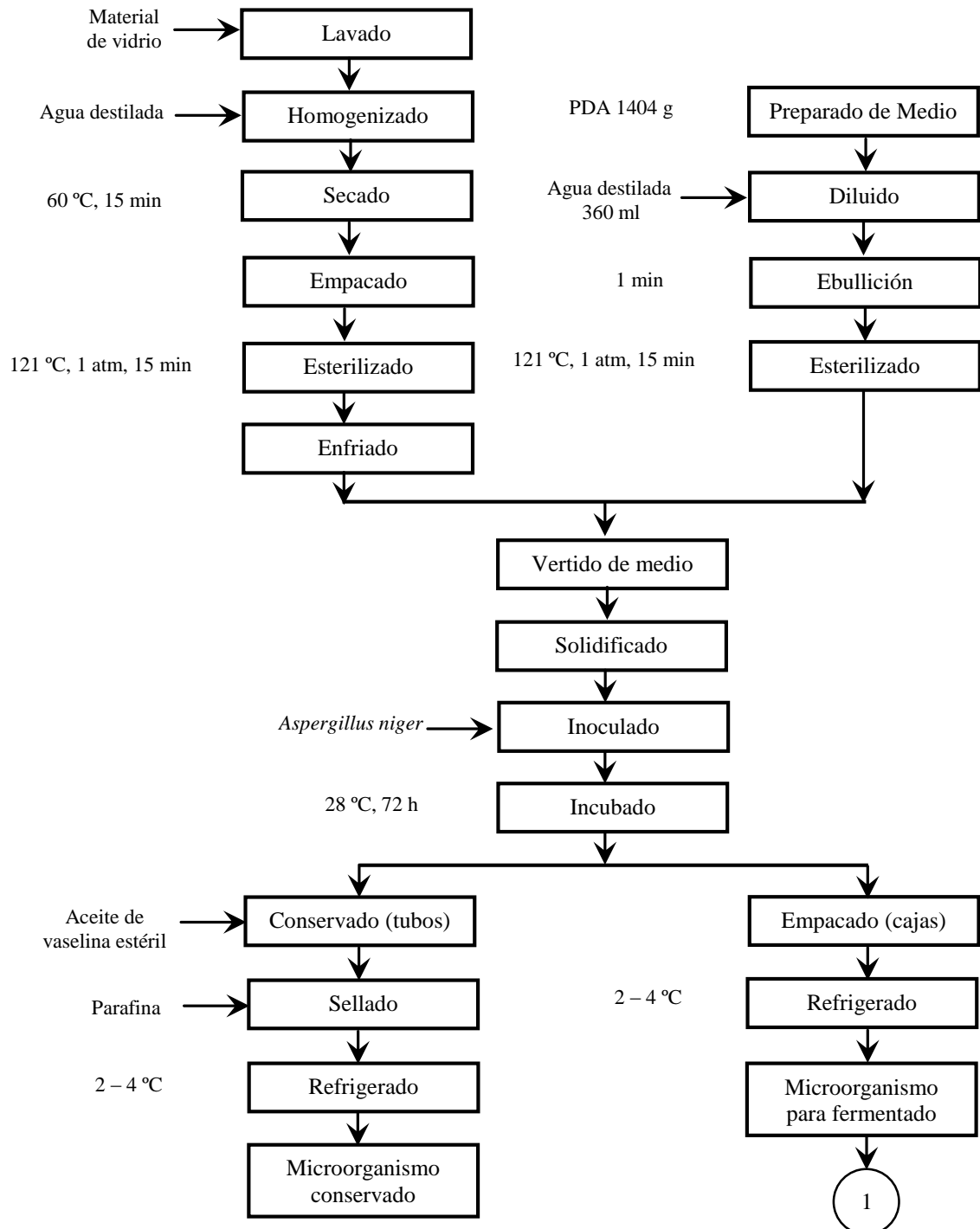
Los cristales obtenidos se encuentran con un grado de humedad elevado, por lo que es necesario realizar un proceso de deshidratación, en donde la temperatura debe ser de 35 ± 1 °C. Una vez concluida esta etapa, se procedió a pesar el producto e inmediatamente se envasó en frascos de vidrio.



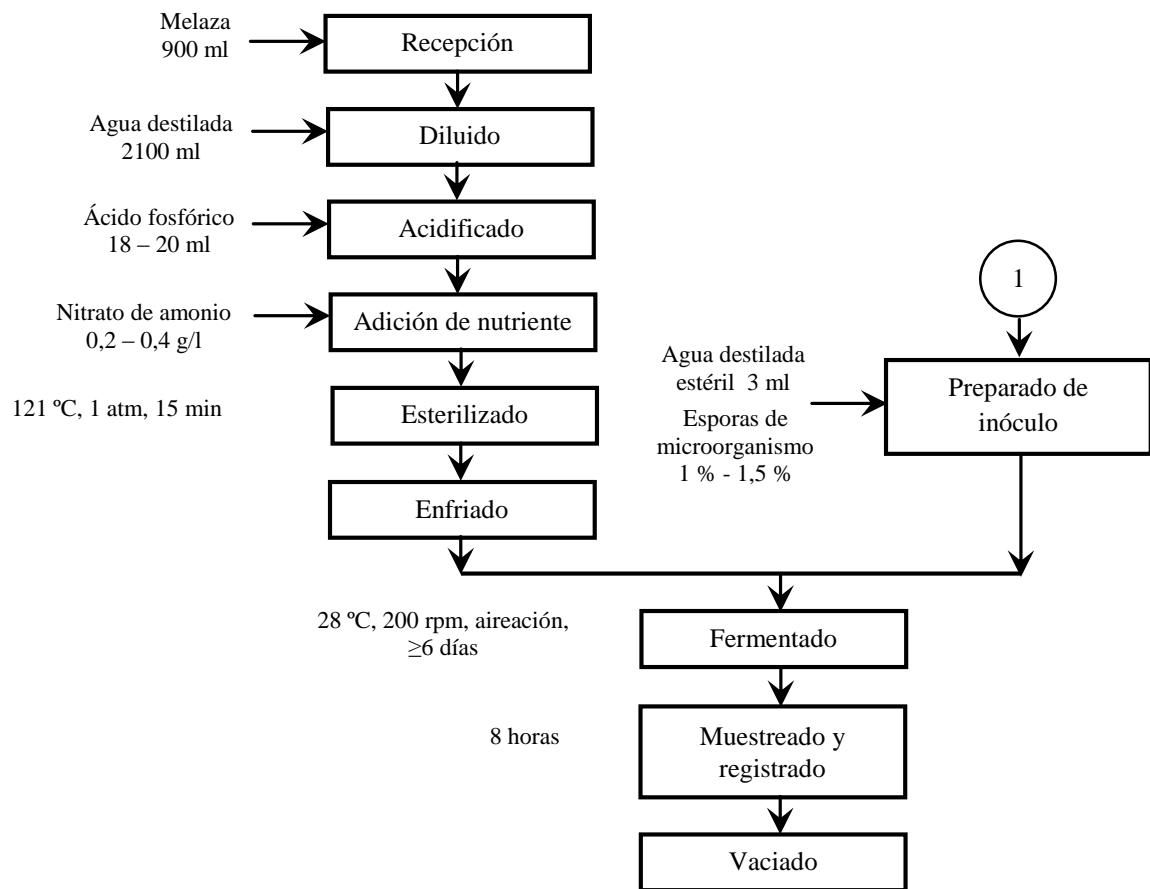
3.4 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

3.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

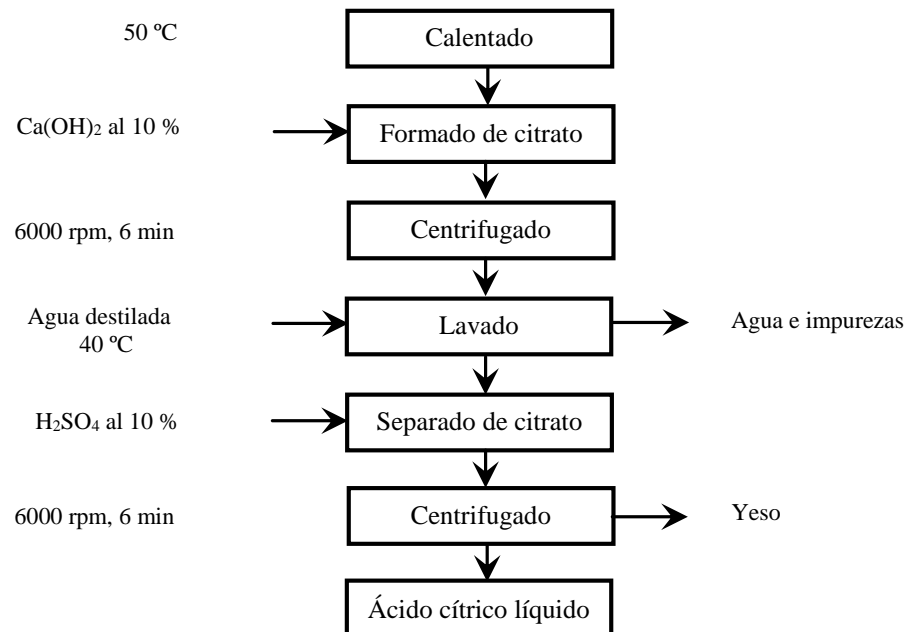
3.4.1.1 Reproducción y conservación de la cepa



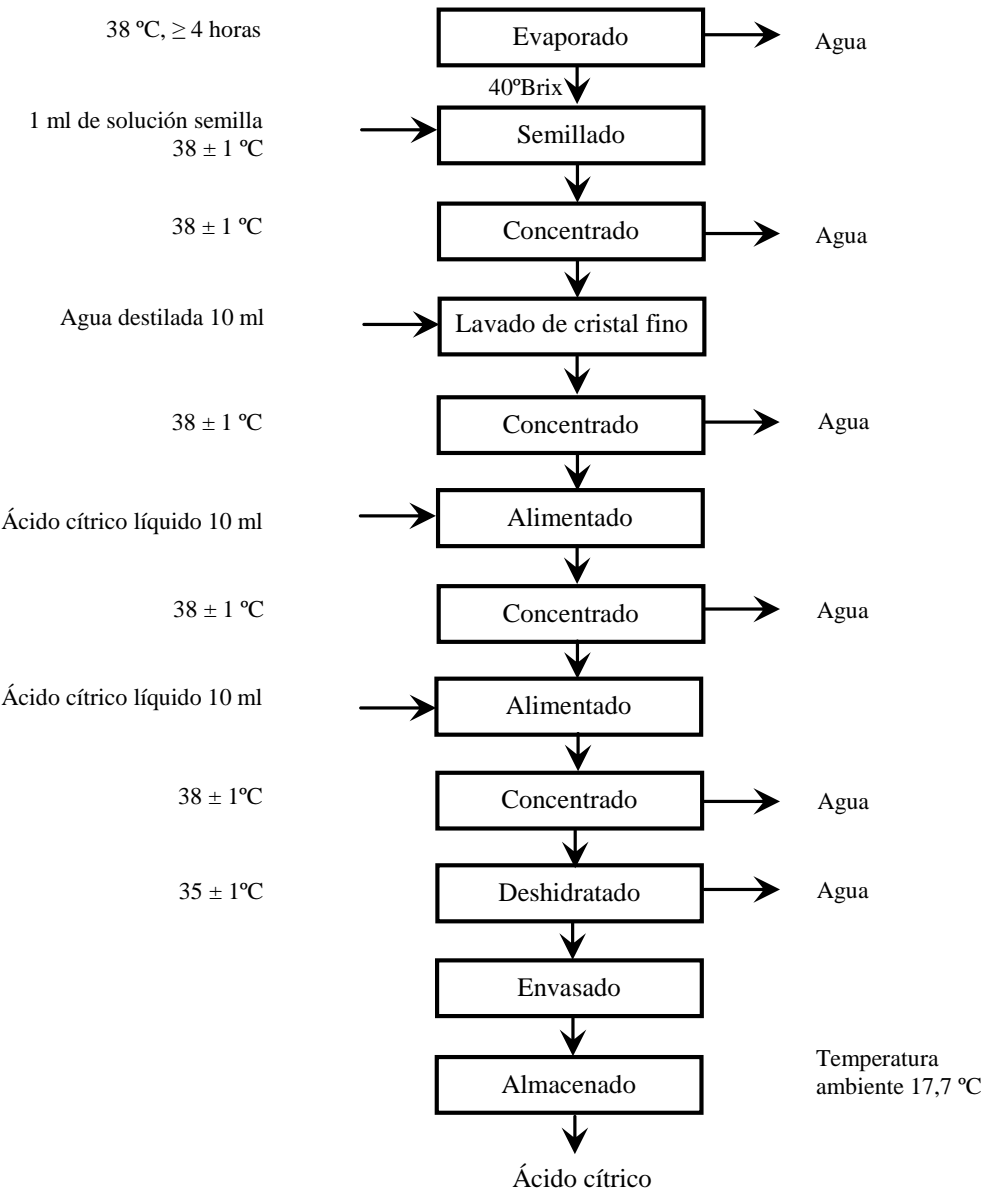
3.4.1.2 Etapa de fermentación



3.4.1.3 Etapa de purificación



3.4.1.4 Etapa de cristalización



Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados de la investigación OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888.

Antes de dar inicio a este capítulo se debe tomar en cuenta que los resultados obtenidos fueron positivos solamente con la materia prima melaza, debido a que la cachaza es un medio con bajo contenido nutricional, lo cual hace que no sea un medio apto para el desarrollo del microorganismo, estos resultados se afirman con el análisis de laboratorio que se realizó para comparar los dos medios (Anexo 1), debido a este motivo los resultados expresados en esta investigación son únicamente de melaza.



Melaza

Cachaza

Fotografía 4. Crecimiento de *Aspergillus niger*

4.1 VARIABLE CURVAS DE pH

Tabla 9. Mediciones de pH durante el proceso de fermentación

Tiempo	A1N1			A1N2			A2N1			A2N2		
h	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	3,52	3,51	3,56	3,50	3,55	3,65	3,48	3,57	3,45	3,49	3,51	3,50
8	3,49	3,58	3,58	3,52	3,59	3,68	3,50	3,59	3,49	3,50	3,50	3,51
16	3,53	3,61	3,56	3,55	3,61	3,70	3,53	3,60	3,51	3,52	3,53	3,50
24	3,50	3,66	3,59	3,60	3,64	3,72	3,56	3,58	3,53	3,52	3,51	3,48
32	3,50	3,65	3,58	3,62	3,67	3,69	3,56	3,56	3,57	3,55	3,53	3,49
40	3,48	3,68	3,60	3,65	3,68	3,66	3,54	3,53	3,55	3,58	3,57	3,51
48	3,51	3,65	3,56	3,68	3,70	3,69	3,57	3,50	3,57	3,57	3,55	3,53
56	3,51	3,63	3,60	3,71	3,69	3,71	3,55	3,55	3,56	3,60	3,59	3,57
64	3,49	3,64	3,63	3,70	3,70	3,69	3,53	3,54	3,53	3,63	3,62	3,59
72	3,51	3,64	3,61	3,69	3,69	3,70	3,56	3,55	3,55	3,61	3,64	3,60
80	3,50	3,63	3,57	3,73	3,72	3,67	3,58	3,53	3,59	3,59	3,61	3,58
88	3,54	3,68	3,58	3,68	3,68	3,69	3,57	3,50	3,61	3,61	3,63	3,61
96	3,54	3,64	3,55	3,69	3,69	3,71	3,55	3,51	3,64	3,62	3,61	3,63
104	3,52	3,66	3,57	3,72	3,72	3,68	3,52	3,53	3,65	3,60	3,60	3,65
112	3,56	3,70	3,59	3,67	3,68	3,63	3,54	3,55	3,61	3,62	3,63	3,63
120	3,70	3,69	3,61	3,70	3,71	3,66	3,56	3,57	3,58	3,59	3,60	3,60
128	3,74	3,63	3,58	3,70	3,70	3,71	3,59	3,60	3,59	3,60	3,58	3,58
136	3,69	3,69	3,56	3,68	3,69	3,67	3,59	3,59	3,60	3,62	3,62	3,60
144	3,72	3,70	3,60	3,65	3,67	3,69	3,56	3,57	3,57	3,63	3,64	3,62
152	3,76	3,67	3,56	3,69	3,71	3,64	3,55	3,55	3,61	3,65	3,62	3,63
160	3,78	3,64	3,57	3,71	3,68	3,68	3,57	3,54	3,63	3,60	3,60	3,60
168	3,82	3,66	3,61	3,68	3,70	3,70	3,59	3,57	3,65	3,64	3,63	3,63
176	3,81	3,73	3,68	3,70	3,69	3,69	3,62	3,59	3,67	3,69	3,65	3,66
184	3,83	3,78	3,71	3,72	3,71	3,67		3,61		3,66	3,67	3,69
192		3,80		3,75	3,72	3,71				3,70	3,69	3,72
200					3,73	3,73					3,73	

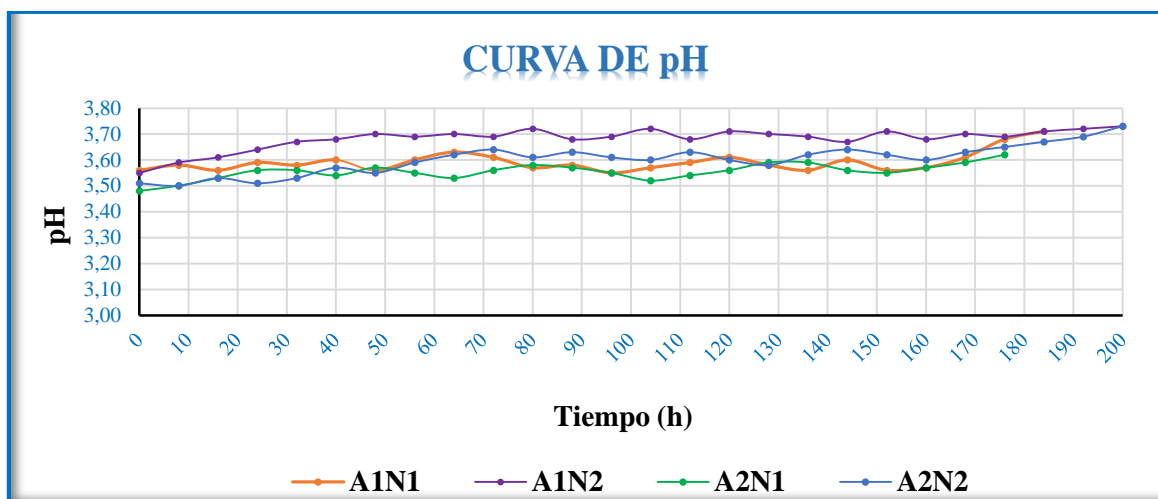


Gráfico 1. Curvas de pH de los cuatro mejores tratamientos

Los valores de pH fueron evaluados cada 8 horas durante toda la etapa de fermentación, en la gráfica de los cuatro mejores tratamientos podemos observar que estos datos de pH se mantienen fluctuando entre valores de 3,5 a 3,8 afirmando que el medio óptimo necesario para el desarrollo del microorganismo debe ser un medio ácido. Esta variable no fue determinante para la finalización de la etapa de fermentación, un indicador de que esta etapa ha finalizado fueron los grados Brix, ya que la cantidad de sacarosa desciende hasta llegar a una estabilidad al ser consumida por el microorganismo y es en este momento cuando se detuvo la etapa de fermentación.

En el año 2004, García et al. menciona que cuando se utiliza *A. niger* el pH inicial depende del medio empleado. Con medio con melazas, el pH inicial debe ser neutro o ligeramente ácido para que se produzca la germinación y el crecimiento.

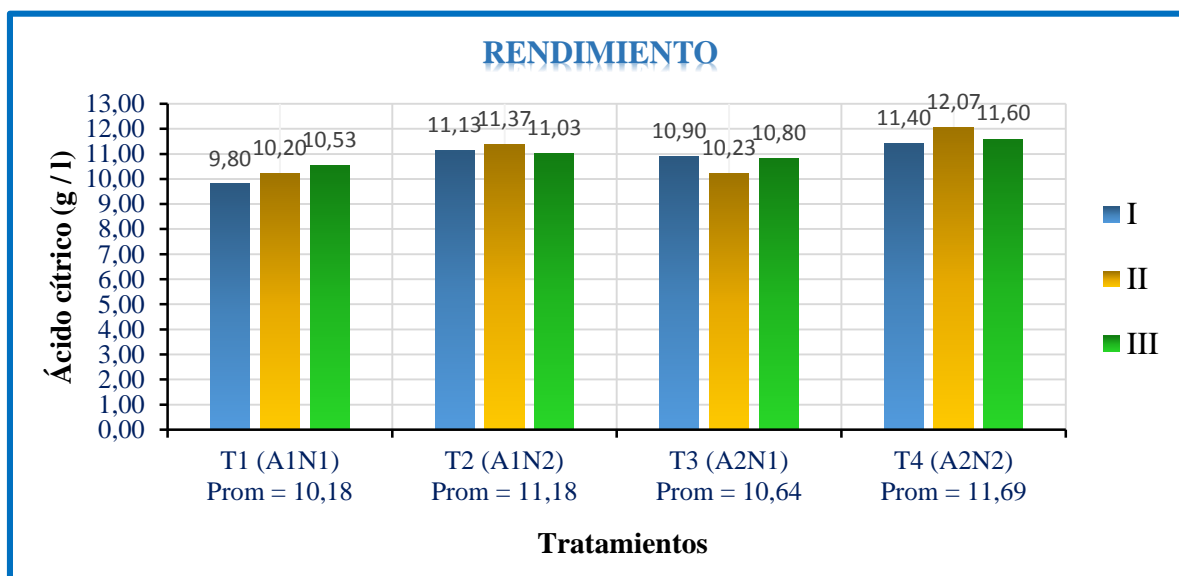
4.2 VARIABLE RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO

Los valores de rendimiento de ácido cítrico se los obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\text{gramos de producto obtenido}}{\text{volumen inicial de fermentación}}$$

Obteniéndose con esta fórmula el rendimiento de ácido cítrico en gramos por cada litro de sustrato, estos valores se expresa en el siguiente gráfico:

Gráfico 2. Rendimiento del ácido cítrico (g / l)



En el gráfico de rendimiento, se puede ver el promedio de cada tratamiento, donde se evidencia que los mejores resultados se los obtiene con los tratamientos **A1N2** (1 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) con un rendimiento de 11,18 g/l de ácido cítrico y **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) con un rendimiento de 11,69 g/l de ácido cítrico. Estos valores podemos comparar con los resultados obtenidos en otras investigaciones, como por ejemplo:

Abín et al. (2004) concluyeron que “La mayor producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5 correspondió a un rendimiento de 10 g/l”.

En su investigación Velásquez et al. (2010), “obtuvieron ácido cítrico a partir de sustrato de pulpa de plátano Dominicano Hartón en estado maduro con un rendimiento de 13.5 g/l de ácido cítrico”.

Demostrando de esta forma que los rendimientos obtenidos se ajustan dentro de un promedio aceptable de producción de ácido cítrico por otros autores.

Tabla 10. Valores de producción en gramos de ácido cítrico

N°	TRAT	REPETICIONES			Σ TRAT	MEDIA
		I	II	III		
T1	A1N1	29,4	30,6	31,6	91,60	30,53
T2	A1N2	33,4	34,1	33,1	100,60	33,53
T3	A2N1	32,7	30,7	32,4	95,80	31,93
T4	A2N2	34,2	36,2	34,8	105,20	35,07
Σ REP		129,70	131,60	131,90	393,20	32,77

Tabla 11. ADEVA

F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
Total	11,00	42,07					
Tratamientos	3,00	34,68	11,56	12,52	**	4,07	7,59
Factor A	1,00	6,45	6,45	6,99	*	5,32	11,26
Factor N	1,00	28,21	28,21	30,56	**	5,32	11,26
I (AXN)	1,00	0,01	0,01	0,01	NS	5,32	11,26
E. Exp.	8,00	7,39	0,92				

$$CV = 2,93 \%$$

** : Altamente significativo

* : Significativo

NS: No significativo

Una vez realizado el ADEVA, se detectó diferencia altamente significativa para tratamientos y para el factor N (cantidad de nutriente); mientras que, para el factor A (porcentaje de inóculo) existe significación estadística. Y para la interacción AxN no existe significación estadística.

Al existir diferencia significativa se procedió a realizar las pruebas de Tukey al 5 % para tratamientos y DMS para los factores A y N.

El coeficiente de variación es de 2,93 % lo que nos indica que se encuentra dentro de los límites de aceptación para una investigación a nivel de laboratorio.

Tabla 12. Prueba de significación de Tukey al 5 % para tratamientos: Rendimiento del ácido cítrico

TRATAMIENTOS		MEDIA	RANGO
T4	A2N2	35,07	a
T2	A1N2	33,53	a
T3	A2N1	31,93	b
T1	A1N1	30,53	c

Como se puede observar en la Tabla 12, el tratamiento **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) y el tratamiento **A1N2** (1 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) se sitúan en el rango “a”, lo que demuestra que estos tratamientos son los más sobresalientes con respecto al rendimiento de ácido cítrico y a la vez nos indican que el factor N (0,4 g/l de nutriente) influye directamente en la cantidad final de producto obtenido.

Tabla 13. Prueba de significación DMS para el factor A (porcentaje de inóculo)

FACTOR A	MEDIA	RANGO
A2	33,50	a
A1	32,03	b

En la prueba de significación DMS, se puede observar que el mejor nivel es **A2** (1,5 % de inóculo) al hallarse dentro del rango “a”; es decir que este porcentaje de inóculo es esencial para lograr mayor producción de ácido cítrico en el menor tiempo posible.

Con la finalidad de visualizar el comportamiento de los tratamientos se construyó el gráfico siguiente:

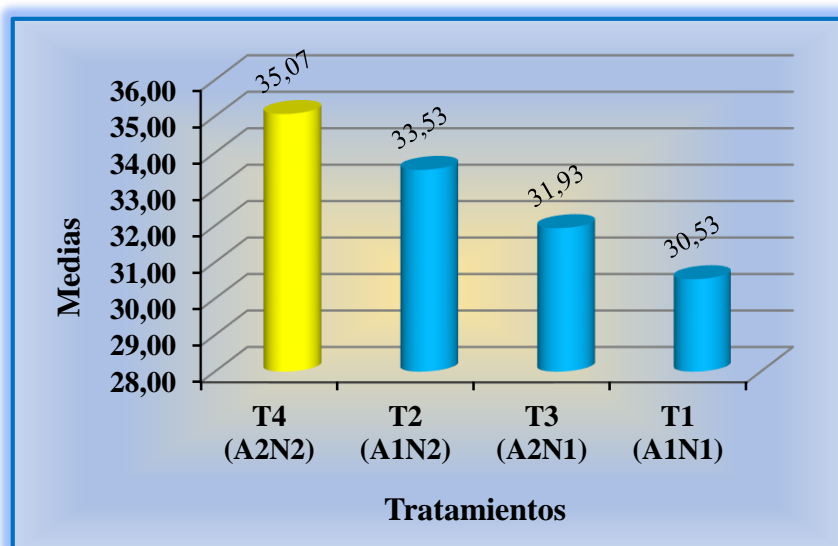


Gráfico 3. Comportamiento de las medias de rendimiento en la obtención de ácido cítrico

El gráfico muestra que el tratamiento **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) es el que mayor cantidad de ácido cítrico produjo.

4.3 VARIABLE PUREZA DEL PRODUCTO TERMINADO

El análisis de pureza se realizó en un laboratorio acreditado por el estado ver Anexo 2, el procedimiento utilizado fue el método volumétrico en base seca, estos análisis se realizaron solamente a los mejores tratamientos debido a los costos elevados de los análisis, los resultados obtenidos son los siguientes:

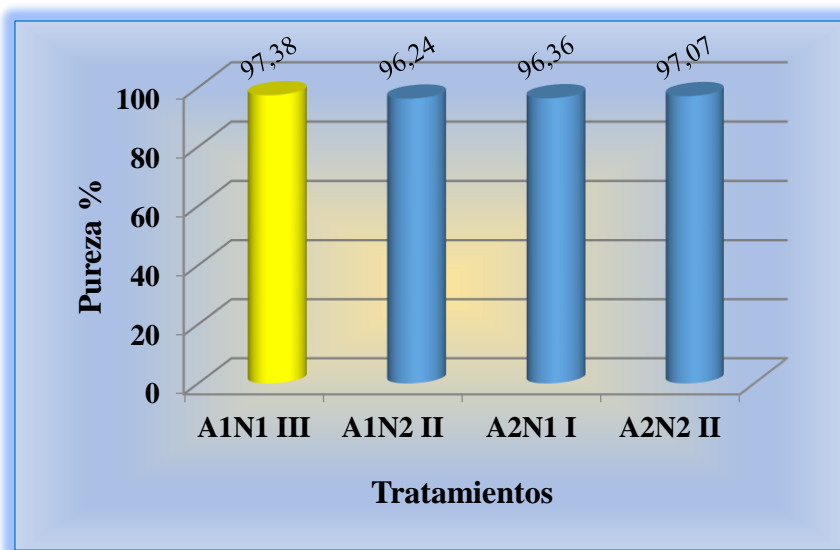


Gráfico 4. Pureza del producto obtenido

En el gráfico se observa el resultado del análisis de pureza en donde se puede evidenciar que todos los tratamientos se encuentran dentro de un rango aceptable de pureza, es decir un porcentaje de pureza mayor al 95 %, en comparación a lo establecido en la norma de calidad del Codex Alimentario INS N°330 (Anexo 4), donde se indica que el porcentaje de pureza del ácido cítrico debe estar ser no menos del 99,5 % y no más del 100,5 %.

4.4 VARIABLE HUMEDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Los análisis de humedad se realizaron en el Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos de la Universidad Técnica del Norte, ver Anexo 2, el método utilizado fue AOAC 925.10, este análisis se realizó a todos los tratamientos, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 14. Valores de humedad del ácido cítrico

N°	TRAT	REPETICIONES			Σ TRAT	MEDIA
		I	II	III		
T1	A1N1	0,48	0,51	0,52	1,51	0,50
T2	A1N2	0,52	0,53	0,51	1,56	0,52
T3	A2N1	0,51	0,50	0,49	1,50	0,50
T4	A2N2	0,50	0,48	0,51	1,49	0,50
Σ REP		2,01	2,02	2,03	6,06	0,51

Tabla 15. ADEVA

F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
Total	11,00	0,00270					
Tratamientos	3,00	0,00097	0,00032	1,49	NS	4,07	7,59
Factor A	1,00	0,00053	0,00053	2,46	NS	5,32	11,26
Factor N	1,00	0,00013	0,00013	0,62	NS	5,32	11,26
I (AXN)	1,00	0,00030	0,00030	1,38	NS	5,32	11,26
E. Exp.	8,00	0,00173	0,00022				

$$CV = 2,91 \%$$

NS: No significativo

El análisis de varianza indica que no existe significación estadística para tratamientos, factor A (porcentaje de inóculo), factor N (cantidad de nutriente) e interacción AxN; debido a que todos los tratamientos fueron secados de forma uniforme hasta llegar a un peso constante.

El coeficiente de variación es de 2,91 % lo que nos indica que se encuentra dentro de los límites de aceptación para una investigación a nivel de laboratorio.

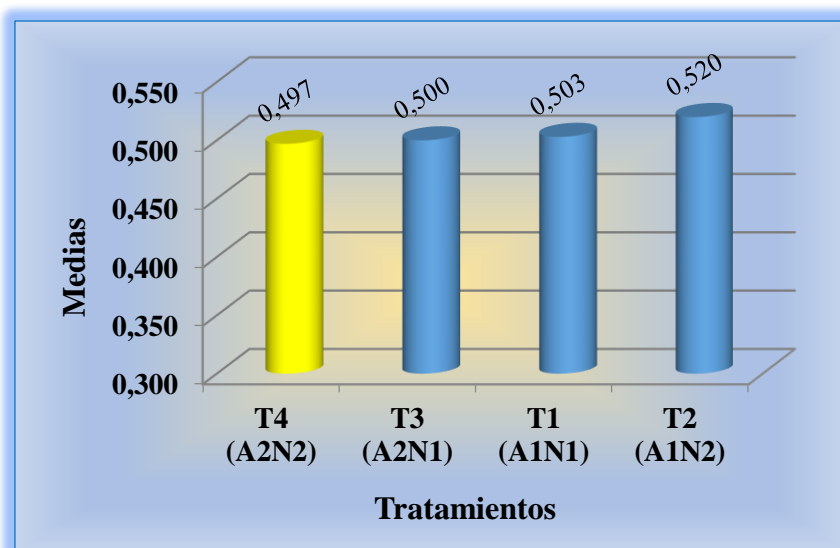


Gráfico 5. Comportamiento de las medias de humedad en la obtención de ácido cítrico

En el gráfico se observa que el tratamiento **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) presenta una humedad baja con respecto a los otros tratamientos.

Según la norma de calidad del Codex Alimentario INS N° 330 indica que el ácido cítrico debe contener una humedad máxima del 0.5 %.

4.5 VARIABLE TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Para obtener el tiempo de fermentación se tomó en cuenta la fecha/hora de inicio y finalización de cada tratamiento, a continuación estos datos se encuentran expresados en cantidad de horas.

Tabla 16. Valores del tiempo de fermentación

N°	TRAT	REPETICIONES			Σ TRAT	MEDIA
		I	II	III		
T1	A1NI	184,00	192,00	184,00	560,00	186,67
T2	A1N2	192,00	200,00	200,00	592,00	197,33
T3	A2N1	176,00	184,00	176,00	536,00	178,67
T4	A2N2	192,00	200,00	200,00	592,00	197,33
Σ REP		744,00	776,00	760,00	2280,00	190,00

Tabla 17. ADEVA

F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
Total	11,00	912,00					
Tratamientos	3,00	741,33	247,11	11,58	**	4,07	7,59
Factor A	1,00	48,00	48,00	2,25	NS	5,32	11,26
Factor N	1,00	645,33	645,33	30,25	**	5,32	11,26
I (AXN)	1,00	48,00	48,00	2,25	NS	5,32	11,26
E. Exp.	8,00	170,67	21,33				

$$CV = 2,43 \%$$

** : Altamente significativo

NS: No significativo

Una vez realizado el análisis de varianza se detectó alta significación estadística para tratamientos y factor N (cantidad de nutriente). Mientras que no existe diferencia significativa para el factor A (porcentaje de inóculo) y para la interacción AxN.

Por lo tanto se efectuó pruebas de significación, Tukey al 5 % para tratamientos y DMS para factor N, ya que este presenta significación estadística.

El coeficiente de variación es de 2,43 % lo que nos indica que se encuentra dentro de los límites de aceptación para una investigación a nivel de laboratorio.

Tabla 18. Prueba de significación Tukey al 5% para tratamientos: Tiempo de fermentación

TRATAMIENTOS		MEDIA	RANGO
T2	A1N2	197,33	a
T4	A2N2	197,33	a
T1	A1N1	186,67	a
T3	A2N1	178,67	b

Al analizar la Tabla 18 se establece dentro del rango “b” como el mejor tratamiento a **A2N1** (1,5 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), esto nos indica que se obtuvo una cantidad aceptable de ácido cítrico en el menor tiempo posible.

Rivada (2008), la fermentación va a ser la etapa más duradera de todo el proceso que tiene lugar en la planta, aproximadamente 6 días. Durante el proceso fermentativo se controlarán distintas variables (temperatura, pH, etc.), para que transcurra de manera correcta y se produzca la mayor cantidad posible de ácido cítrico.

Tabla 19. Prueba de significación DMS para el factor N (cantidad de nutriente)

FACTOR N	MEDIA	RANGO
N2	197,3333	a
N1	182,6667	b

En la prueba de significación DMS se puede observar que el nivel **N1** (cantidad de nutriente) presenta la menor media, encontrándose en el rango “b”, lo que significa que la cantidad de nutriente influye en el tiempo de fermentación.

Con el propósito de observar de mejor manera el comportamiento de los tratamientos se realizó el siguiente gráfico.

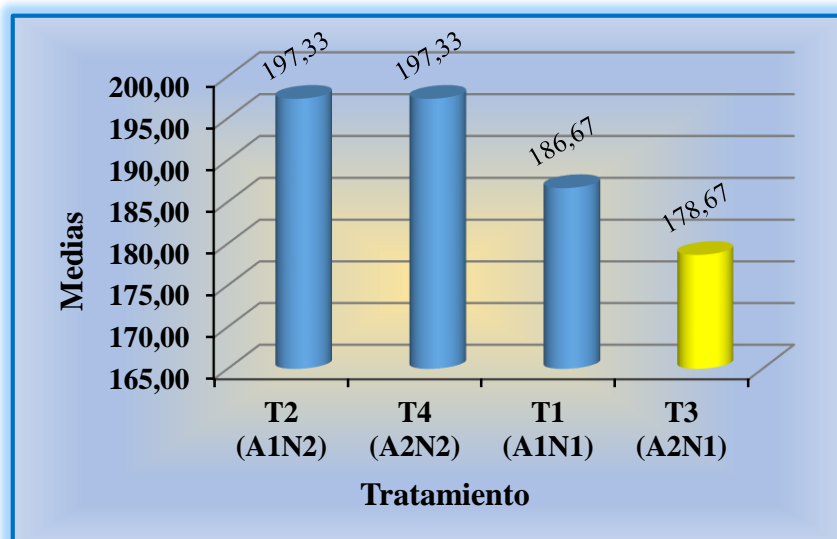


Gráfico 6. Comportamiento de las medias en el tiempo de fermentación para la obtención de ácido cítrico

El gráfico muestra que tanto **A1N1** (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), como **A2N1** (1,5 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente) son los tratamientos que produjeron ácido cítrico en el menor tiempo posible de fermentación.

4.5.1 CURVA DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

La toma de muestras y el registro de datos del recuento de microorganismos se realizaron cada 8 horas durante toda la etapa de fermentación.

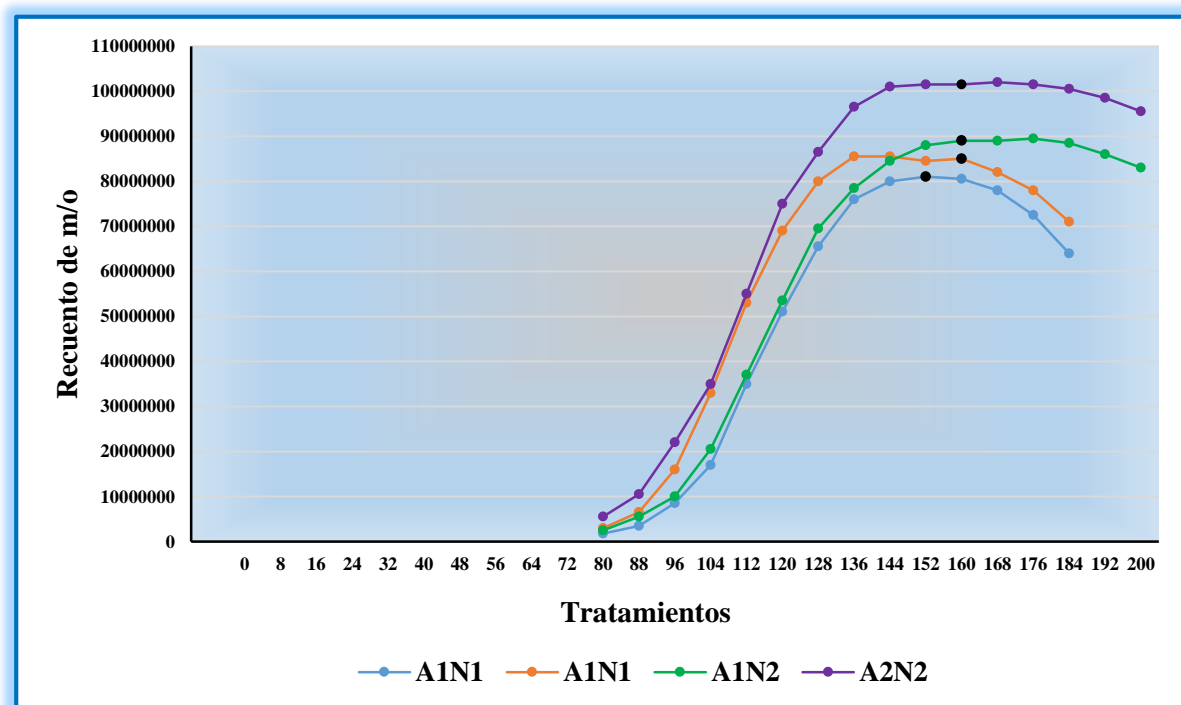


Gráfico 7. Curva de crecimiento de los cuatro mejores tratamientos

Se observa en el Gráfico 7 que el tiempo óptimo de fermentación corresponde al tratamiento **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente), con la cantidad más alta de crecimiento del microorganismo producido en 160 horas y por ende se obtuvo un rendimiento de ácido cítrico elevado.

4.6 INTERACCIONES

Se realizaron las siguientes interacciones con el objetivo de determinar el mejor tratamiento.

4.6.1 RENDIMIENTO - PUREZA

Tabla 20. Resultados de Rendimiento y Pureza en el producto final

Tratamientos	Rendimiento	Pureza
A1N1	10,18	97,38
A1N2	11,18	96,24
A2N1	10,64	96,36
A2N2	11,69	97,07

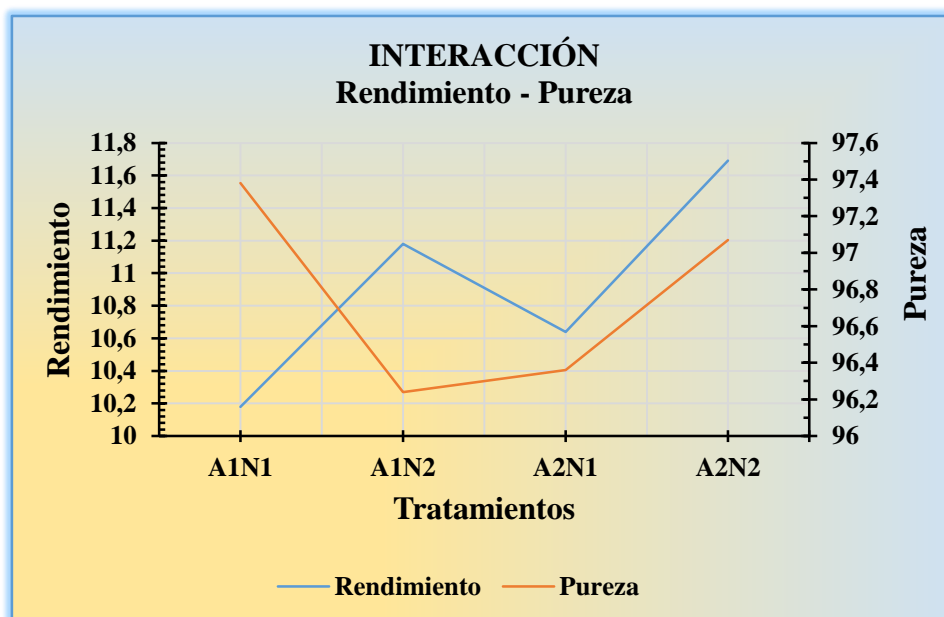


Gráfico 8. Interacción Rendimiento - Pureza

4.6.2 PUREZA – TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Tabla 21. Resultados de Pureza – Tiempo de fermentación

Tratamientos	Pureza	Tiempo de fermentación
A1N1	97,38	186,67
A1N2	96,24	197,33
A2N1	96,36	178,67
A2N2	97,07	197,33

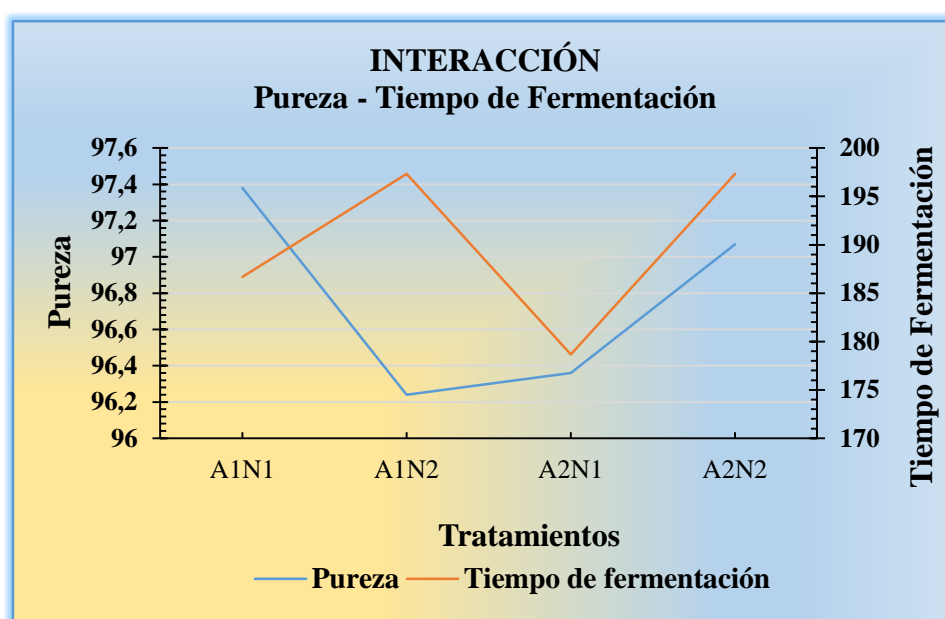


Gráfico 9. Interacción Pureza – Tiempo de Fermentación

En los Gráficos 8 y 9 podemos observar que las interacciones entre Rendimiento – Pureza y Pureza – Tiempo de Fermentación, apuntan a que el mejor tratamiento es **A1N1** (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), debido a que el grado de pureza es elevado en comparación al resto de tratamientos, lo que nos indica que a pesar de que su rendimiento sea menor, su contenido de ácido cítrico se encuentra más libre de impurezas, de igual manera se puede observar que el tiempo de fermentación es aceptable ya que no difiere del menor tiempo con tan solo 8 horas.

4.7 BALANCE DE MATERIALES

Tratamiento A1N1

ETAPA DE FERMENTACIÓN

Materias primas

Melaza = 900 ml

Agua Destilada = 2100 ml

Insumos

Ácido Fosfórico = 18,6 ml

Nitrato de Amonio
(diluido) = 3 ml

Indeterminados = -10 ml

Sustrato = 3011,6 ml

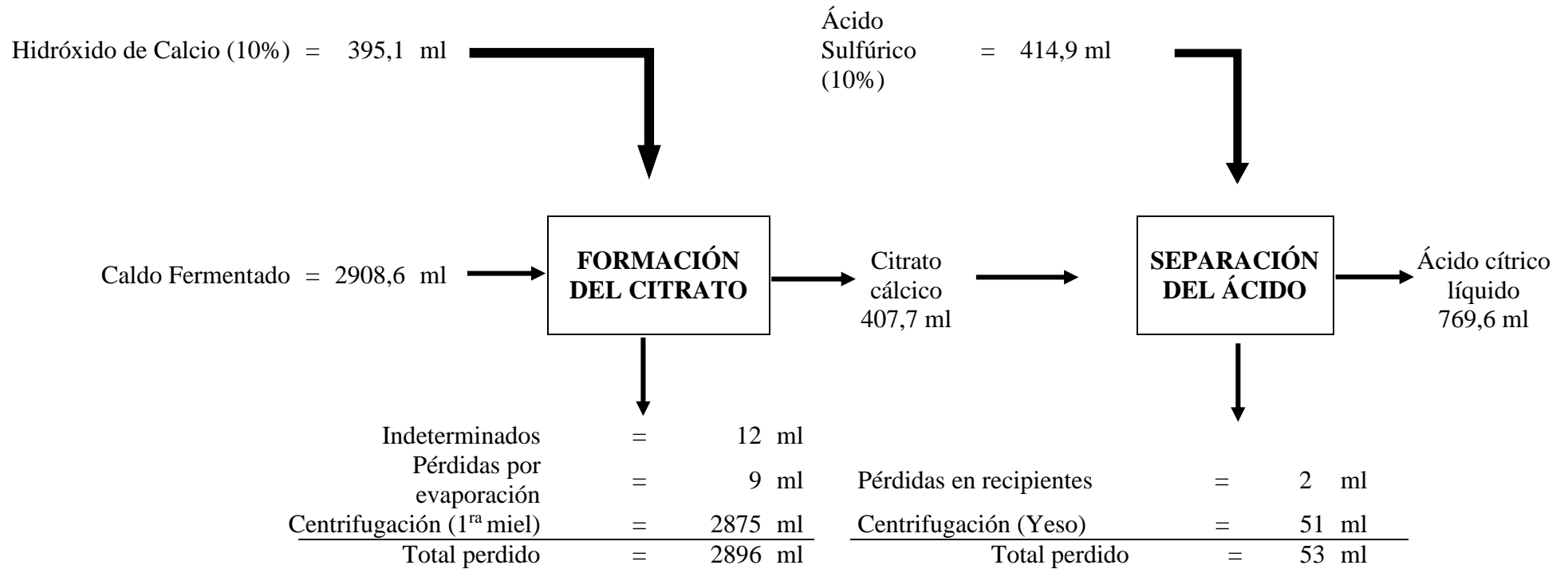
FERMENTACIÓN

Caldo Fermentado

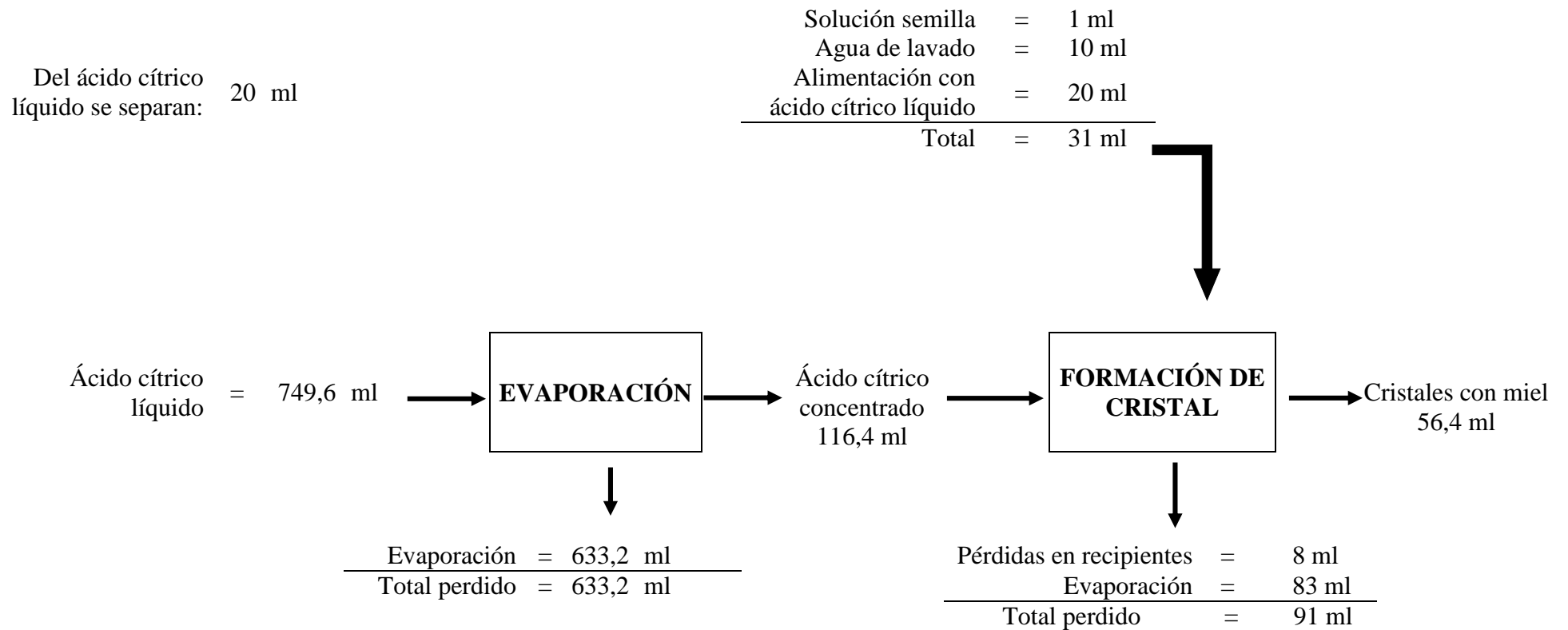
2908,6 ml

Muestreo	75 ml
Evaporación	22 ml
Indeterminados	6 ml
<hr/>	
Total perdido	103 ml

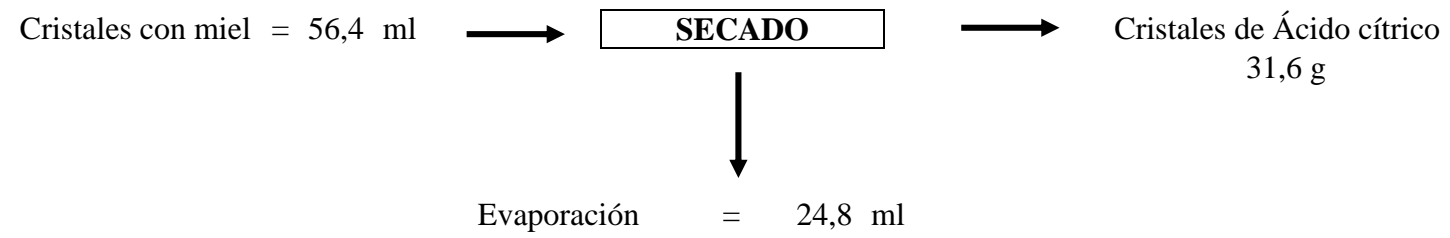
ETAPA DE PURIFICACIÓN



ETAPA DE CRISTALIZACIÓN



ETAPA DE SECADO



4.8 COSTOS DE PRODUCCIÓN

Para producir 31,6 g de ácido cítrico se ha realizado un balance de costos, los cuales se detallan a continuación.

Tabla 22. Costos de producción de ácido cítrico

Producción de Ácido Cítrico (31,6 g)				
		Cantidad	Unidad	Valor Total (USD)
Materia Prima	Melaza	0,9	l	0,09
Insumos	Agua destilada	2,1	l	1,05
	<i>Aspergillus niger</i>	1/4	caja	0,55
Reactivos	Nutriente (Nitrato de amonio)	0,6	g	0,08
	Ácido fosfórico	18,6	ml	0,08
	Hidróxido de calcio	30	g	2,41
	Ácido sulfúrico	27,97	ml	0,44
Otros	Electricidad / Biorreactor	10,80	kW/h	0,99
TOTAL				5,69

En la Tabla 23 podemos observar los costos de los diferentes tipos de ácido cítrico que encontramos en el mercado local.

Tabla 23. Costos de los tipos de ácido cítrico en el mercado local

Costos de Ácido Cítrico			
Proveedores	Cantidad		Precio (USD)
MM Representaciones	Alimenticio	1 kg	3,92
	Analítico	500 g	40,32
La casa de los químicos	Alimenticio	1 kg	2,18
	Reactivo	100 g	3,36
SOLVESA	Alimenticio	50 kg	72,50
QUIMATEC	Alimenticio	50 kg	67,20
PROVEQUIM C.A.	Alimenticio	50 kg	66,00

Capítulo V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Luego de haber realizado la investigación sobre **“OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888”**, se ha llegado a las conclusiones siguientes:

- ∅ Al utilizar melaza como sustrato, se observó un excelente crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, concluyendo así, que este sustrato es un medio de cultivo idóneo para el desarrollo de este, esto se confirma con los resultados de los análisis físicos – químicos, en donde se evidencia un alto contenido de carbohidratos, mientras que al utilizar cachaza, se observó que no existe crecimiento del microorganismo, ya que este sustrato no aporta con los carbohidratos necesarios para el desarrollo del mismo, resultado que se confirma con el mismo análisis mencionado.
- ∅ Durante toda la etapa de fermentación, se observó que los valores de pH se mantuvieron fluctuando entre 3,5 – 3,8; por lo que se concluye que, la producción de ácido cítrico se lleva a cabo durante todo el proceso de crecimiento del microorganismo.
- ∅ Una vez realizado el análisis de varianza en lo que respecta al rendimiento se determinó que el tratamiento A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) es el que mayor cantidad de ácido cítrico produce, logrando un rendimiento de 12,07 g/l.
- ∅ En lo que respecta a la pureza del producto obtenido se realizó el análisis para los cuatros mejores tratamientos, determinando que el tratamiento A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente) tiene una pureza del 97,38 %, encontrándose dentro de un

rango aceptable, tomando como referencia la norma de calidad del Codex Alimentario INS N° 330.

- ∅ Al analizar la cinética de las curvas de crecimiento, se determina que el tratamiento A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) tiene un tiempo óptimo de fermentación de 160 horas, tomando en cuenta que la producción promedio más alta de ácido cítrico fue de 35,07 g.
- ∅ Al realizar el análisis de humedad del producto, tomando como referencia la norma establecida por el Codex Alimentario en la que se establece que el ácido cítrico debe contener una humedad máxima del 0,5 %, tenemos que el mejor tratamiento es A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) al presentar un humedad media de 0,497 %.
- ∅ En lo que se refiere a la obtención de ácido cítrico en el menor tiempo de fermentación, se determinó que el mejor tratamiento es el A2N1 (1,5 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente) ya que concluye su etapa de fermentación a las 178 horas.
- ∅ Una vez realizadas las interacciones entre Rendimiento – Pureza y Pureza – Tiempo de Fermentación, se concluye que el mejor tratamiento es A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), observando que su grado de pureza es de 97,38 %, con un rendimiento de 10,18 g/l y un tiempo de fermentación aceptable de 186,67 horas.
- ∅ Se acepta parcialmente la hipótesis afirmativa planteada al inicio de la investigación, es decir, que los subproductos de la industria azucarera (melaza) y la cantidad de nutriente permiten obtener ácido cítrico, mientras que la cachaza no es una materia prima adecuada para la obtención de ácido cítrico.

5.2 RECOMENDACIONES

- ∅ La fuente de materia orgánica y sacarosa que se utilizó (melaza), para el desarrollo del microorganismo fue esencial en la investigación, por esta razón se recomienda el análisis de otras fuentes ricas en materia orgánica y sacarosa como podrían ser otros residuos agroindustriales.
- ∅ Dentro del proceso de purificación, se recomienda utilizar un método de clarificación eficiente para el ácido cítrico líquido, antes de continuar con la etapa de cristalización.
- ∅ El procedimiento que se utilizó en la etapa de cristalización, se fundamentó en el método de semillamiento por choque que se utiliza en la industria azucarera, se recomienda utilizar un equipo específico para realizar este proceso dentro de la obtención de ácido cítrico.
- ∅ Se recomienda realizar una investigación, donde se ensaye el proceso fermentativo de obtención de ácido cítrico, con otro tipo de microorganismo.
- ∅ Se recomienda realizar un análisis para determinar el grado de uso (medicamentos, laboratorio o alimentos) del ácido cítrico que se obtiene, al utilizar el método que se ha establecido en esta investigación.
- ∅ Realizar un estudio de factibilidad para la implementación de una planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de la industria azucarera, con el fin de cubrir la demanda nacional del producto.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Abín, L., Coto, O., Marrero, B., & Marrero, J. (2004). Estudio fisiológico de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* 0-5. *CENIC. Ciencias Biológicas*.
2. Bristhar Laboratorios C.A. (2010). *bristhar.com.ve*.
<http://www.bristhar.com.ve/acidocitrnico.html>.
3. Campués Tulcán, J. K., & Tarupí Rosero, J. C. (2011). *Obtención de Alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento (saccharomyces cerevisiae)*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
4. Centro Nacional de Producción más Limpia Honduras , & International Resources Group. (2009). Guía de buenas prácticas ambientales para el procesamiento de caña de azúcar. *Proyecto Manejo Integrado de Recursos Ambientales*, 15. Obtenido de <http://www.mirahonduras.org/cafta/gbpa/GBPA%20cana%20de%20azucar.pdf>.
5. Chang, R. (2009). *Química II: Manual de Actividades*. McGraw - Hill.
6. CINCAE. (15 de Abril de 2013). *Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador*. Obtenido de www.cincae.org.
7. Delta Enfoque S.A. (2009). *ÁCIDO CÍTRICO*. (I. Garduño Laguna, Ed.) *Alimentaria Online*.
8. Duque, N. (2008). *Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Miconia caudata, Miconia sp, Clidemia hirta y Hamelia patens; frente a los hongos Aspergillus niger y Candida albicans*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
9. Espinoza Chancay, P., & Pincay Porras, S. (2012). *Elaboración de una Bebida Probiótica con Cultivos de Típicos*. Guayaquil.
10. Explored. (22 de Noviembre de 2011). *Explored archivo digital de noticias*. Obtenido de <http://www.explored.com.ec/noticias-ecuador/imbabura-y-loja-poseen-larga-tradicion-en-produccion-azucarera-515919.html>.
11. Federación Nacional de Productores de Panela. (2009). [fedepanela.org.co](http://www.fedepanela.org.co/pdfs/Subproductos.pdf).
<http://www.fedepanela.org.co/pdfs/Subproductos.pdf>.
12. Freire Reyes, A. E., & Landázuri Ortiz, R. K. (2011). *Determinación de los requisitos mínimos de calidad para Panela, Azúcar Orgánico y Miel Hidrolizada en la Provincia de Imbabura*.

13. García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., & López - Munguía Canales, A. (2004). *Biotecnología Alimentaria* (Quinta ed.). México, D.F.: LIMUSA, S.A. DE C.V. GRUPO NORIEGA EDITORES.
14. Gilces Farías, P. E., & Veloz Pinto, P. S. (2006). *Estudio de uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico*. Guayaquil.
15. Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. EUNED.
16. INAMHI, & Imbaquingo, D. (05 de Enero de 2015). Datos metereológicos INAMHI. (F. Terán, Entrevistador).
17. Ingenio Azucarero del Norte. (2010). *Azúcar Tababuela*. Obtenido de <http://www.tababuela.com/>.
18. Jordá, M. (2011). *Diccionario práctico de gastronomía y salud*. Madrid: Albasanz.
19. MAKYMAT - Innovación, Calidad y Servicio. (2009). Ácido Cítrico. MAKYMAT.
20. McCabe, W., Smith, J., & Harriott, P. (2007). *Operaciones unitarias en ingeniería química* (Séptima ed.). McGraw-Hill.
21. Meade, G. (1967). *Manual del Azúcar de Caña*. MONTANER Y SIMON, S.A.
22. Norma de calidad INS N° 330 Codex Alimentarius.
23. Quezada Moreno, W. F. (2007). *Guía Técnica de Agroindustria Panelera*. Ibarra.
24. Romero Robles, L., & Rodríguez Esparza, B. (2014). *Química experimental. Manual de Laboratorio*. Pearson Educación.
25. Sánchez, O., Ortiz, M., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *aspergillus niger* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 48.
26. Sarria, P., Solano, A., & Preston, T. (1990). *Utilización de jugo de caña y cachaza panelera en la alimentación de cerdos*. Obtenido de <http://www.lrrd.org/lrrd2/2/sarria.htm>.
27. Velásquez, J., Beltrán , D., Padilla, L., & Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (musa aab simmonds) maduro. . *Tumbaga*, 135.
28. White, M. (2010). *Clasificación del Aspergillus niger*. http://www.ehowenespanol.com/clasificacion-del-aspergillus-niger-sobre_47007/.

ANEXOS

ANEXO 1

Análisis físicos – químicos de melaza y cachaza



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002-CONEA-2010-129-DC.
Resolución No. 001-073-CEAACES-2013-13

Informe Nº:	203-2014
Análisis solicitado por:	Sr. Felipe Terán
Empresa:	Ninguna
Muestreado:	Propietario
Fecha de recepción:	25 de noviembre de 2014
Fecha de entrega informe:	08 de diciembre de 2014
Ciudad:	Ibarra
Provincia:	Imbabura

#	Muestra	Codificación o # de Lote
1	Cachaza	Ninguno
2	Melaza	Ninguno

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado		Metodo de ensayo
		Cachaza	Melaza	
Sólidos Totales	%	14,28	89,54	AOAC 925.10
Cenizas	%	2,05	11,3	AOAC 923.03
Sólidos Solubles como sacarosa	%	15	80	NTE INEN 380
pH		3,06	6,07	AOAC 981.12
Materia Orgánica	%	12,23	78,24	Oxidación Dicromato
Nitrógeno total	%	0,61	3,91	Kjeldalh
Potasio	%	2,61	3,3	Absorción Atómica
Sodio	mg/100 g	0,85	1,07	

Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas

Atentamente:

Blaq. José Luis Moreno
Técnico de Laboratorio



Visión Institucional

La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales.

Av. 17 de Julio S-21 y José María
Córdova. Barrio El Olivo
Teléfono: (06)2997800
Fax: Ext. 7711
Email: utn@utn.edu.ec
www.utn.edu.ec
Ibarra - Ecuador

ANEXO 2

Análisis de humedad del producto terminado



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002 – CONEA – 2010 – 129 – DC.
Resolución No. 001 – 073 – CEAACES – 2013 – 13

FICAYA

Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos

Informe Nº:	011 - 2015
Análisis solicitado por:	Sr. Felipe Terán
Empresa:	No Aplica
Muestreado:	Propietario
Fecha de recepción:	04 de febrero de 2015
Fecha de entrega informe:	09 de febrero de 2015
Ciudad:	Ibarra
Provincia:	Imbabura

#	Muestra	Marca Comercial	Codificación o # de Lote
1	A1N1 I	No Aplica	No Aplica
2	A1N2 I	No Aplica	No Aplica
3	A2N1 I	No Aplica	No Aplica
4	A2N2 I	No Aplica	No Aplica
5	A1N1 II	No Aplica	No Aplica
6	A1N2 II	No Aplica	No Aplica
7	A2N1 II	No Aplica	No Aplica
8	A2N2 II	No Aplica	No Aplica
9	A1N1 III	No Aplica	No Aplica
10	A1N2 III	No Aplica	No Aplica
11	A2N1 III	No Aplica	No Aplica
12	A2N2 III	No Aplica	No Aplica

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado						Metodo de ensayo
		1	2	3	4	5	6	
Contenido de Agua	%	0,48	0,52	0,51	0,5	0,51	0,53	AOAC 925.10

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado						Metodo de ensayo
		7	8	9	10	11	12	
Contenido de Agua	%	0,5	0,48	0,52	0,51	0,49	0,51	AOAC 925.10

Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas

Atentamente:

Bloq. José Luis Moreno
Técnico de Laboratorio



Visión Institucional

La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales.

Av. 17 de Julio S-21 y José María
Córdova Barrio El Olivo
Teléfono: (06)2987800
Fax Ext: 7711
Email: utn@utn.edu.ec
www.utn.edu.ec
Ibarra - Ecuador

ANEXO 3

Análisis de pureza



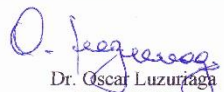
INFORME DE RESULTADOS

Orden de Trabajo N° 144788
Hoja 1 de 1

NOMBRE DEL CLIENTE: FELIPE TERAN
DIRECCIÓN: Los Ceibos, Ibarra
FECHA DE RECEPCIÓN: 18 de diciembre del 2014
MUESTRA: Acido cítrico A1N1M2 III
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Granulado color café
FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 17 de diciembre del 2014
FECHA DE VENCIMIENTO: -----
LOTE: -----
ENVASE: Funda de polietileno
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 18 - 24 de diciembre del 2014
REFERENCIA: 144788
MUESTREADO: Por cliente
CONDICIONES AMBIENTALES: 23°C 36%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Humedad (%)	PEE/LA/02 INEN 540	2.51
Pureza (%)	Volumétrico	97.38


Dr. Oscar Luzuriaga
PRESIDENTE

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.

Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12 B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 0999590-412

www.labolab.com.ec

e-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / cecillialuzuriaga@labolab.com.ec
Quito - Ecuador

LABOLAB

ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

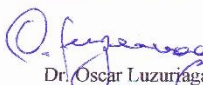
INFORME DE RESULTADOS

Orden de Trabajo N° 144790
Hoja 1 de 1

NOMBRE DEL CLIENTE: FELIPE TERAN
DIRECCIÓN: Los Ceibos, Ibarra
FECHA DE RECEPCIÓN: 18 de diciembre del 2014
MUESTRA: Acido cítrico Doble Nutriente
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Granulado color café
FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 17 de diciembre del 2014
FECHA DE VENCIMIENTO: -----
LOTE: -----
ENVASE: Funda de polietileno
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 18 – 24 de diciembre del 2014
REFERENCIA: 144790
MUESTREADO: Por cliente
CONDICIONES AMBIENTALES: 23°C 36%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Humedad (%)	PEE/LA/02 INEN 540	2.97
Pureza (%)	Volumétrico	97.03


 Dr. Oscar Luzuriaga
 PRESIDENTE

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.

Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros
 Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12 B - 2do. Piso - Telefax : 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 0999590-412

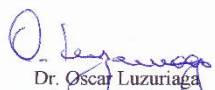

www.labolab.com.ec

e-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / ceciliatluzuriaga@labolab.com.ec
 Quito - Ecuador

NOMBRE DEL CLIENTE: FELIPE TERAN
DIRECCIÓN: Los Ceibos, Ibarra
FECHA DE RECEPCION: 18 de diciembre del 2014
MUESTRA: Acido cítrico A2N2M2 II
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Granulado color café
FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 17 de diciembre del 2014
FECHA DE VENCIMIENTO: -----
LOTE: -----
ENVASE: Funda de polietileno
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 18 – 24 de diciembre del 2014
REFERENCIA: 144786
MUESTREADO: Por cliente
CONDICIONES AMBIENTALES: 23°C 36%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Humedad (%)	PEE/LA/02 INEN 540	3.04
Pureza (%)	Volumétrico	97.07


Dr. Oscar Luzuriaga
PRESIDENTE


El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros
Av. Pérez Guerrero De 21-11 y Versalles - Of. 12 B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 0999590-412
e-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / cecilia.luzuriaga@labolab.com.ec
Quito - Ecuador

www.labolab.com.ec

LABOLAB

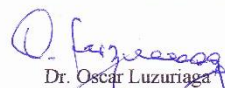

ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES
INFORME DE RESULTADOS

Orden de Trabajo N° 144785
Hoja 1 de 1

NOMBRE DEL CLIENTE: FELIPE TERAN
DIRECCIÓN: Los Ceibos, Ibarra
FECHA DE RECEPCIÓN: 18 de diciembre del 2014
MUESTRA: Acido cítrico A2N1M2 1
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Granulado color café
FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 17 de diciembre del 2014
FECHA DE VENCIMIENTO: -----
LOTE: -----
ENVASE: Funda de polietileno
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 18 - 24 de diciembre del 2014
REFERENCIA: 144785
MUESTREO: Por cliente
CONDICIONES AMBIENTALES: 23°C 36%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Humedad (%)	PEE/LA/02 INEN 540	3.61
Pureza (%)	Volumétrico	96.36


Dr. Oscar Luzuriaga
PRESIDENTE


El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12 B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 0999590-412
e-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / cecilia.luzuriaga@labolab.com.ec
Quito - Ecuador

www.labolab.com.ec



ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

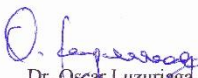
INFORME DE RESULTADOS

Orden de Trabajo N° 144787
Hoja 1 de 1

NOMBRE DEL CLIENTE: FELIPE TERAN
DIRECCIÓN: Los Ceibos, Ibarra
FECHA DE RECEPCION: 18 de diciembre del 2014
MUESTRA: Acido cítrico A1N2M2 II
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Granulado color café
FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 17 de diciembre del 2014
FECHA DE VENCIMIENTO: -----
LOTE: -----
ENVASE: Funda de polietileno
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 18 - 24 de diciembre del 2014
REFERENCIA: 144787
MUESTREADO: Por cliente
CONDICIONES AMBIENTALES: 23°C 36%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Humedad (%)	PEE/LA/02 INEN 540	3.76
Pureza (%)	Volumétrico	96.24


Dr. Oscar Luzuriaga
PRESIDENTE

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.

Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA REGISTRO SANITARIO

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros
Av. Pérez Guerrero Oe 21-11 y Versalles - Of. 12 B - 2do. Piso - Telefax.: 2563-225 / 2235-404 / 3214-333 / 3214-353 Cel.: 0999590-412

www.labolab.com.ec

e-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / cecilia.luzuriaga@labolab.com.ec
Quito - Ecuador

ANEXO 4

Norma INS N° 330 Codex Alimentarius (1 de 2)

FAO JECFA Monographs 16

1

CITRIC ACID

Prepared at the 79th JECFA (2014), published in FAO JECFA Monographs 16 (2014), superseding specifications prepared at the 53rd JECFA (1999), published in FNP 52 Add 7 (1999). Group ADI "Not limited" for citric acid and its calcium, potassium, sodium and ammonium salts established at the 17th JECFA in 1973.

SYNONYMS

INS No. 330

DEFINITION

Citric acid may be produced by recovery from sources such as lemon or pineapple juice or fermentation of carbohydrate solutions or other suitable media using *Candida* spp. or non-toxicogenic strains of *Aspergillus niger*

Chemical names

2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid

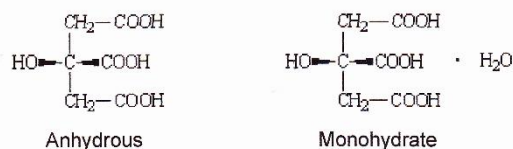
C.A.S. number

77-92-9 (anhydrous)
5949-29-1 (monohydrate)

Chemical formula

$C_6H_8O_7$ (anhydrous)
 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (monohydrate)

Structural formula



Formula weight

192.13 (anhydrous)
210.14 (monohydrate)

Assay

Not less than 99.5% and not more than 100.5% on the anhydrous basis

DESCRIPTION

White or colourless, odourless, crystalline solid; the monohydrate form effloresces in dry air

FUNCTIONAL USES

Acidifier; sequestrant; antioxidant synergist; flavouring agent (see "Flavouring agents" monograph)

CHARACTERISTICS

IDENTIFICATION

Solubility (Vol.4)

Very soluble in water; freely soluble in ethanol; slightly soluble in ether

Test for citrate (Vol. 4)

Passes test

Norma 330 Codex Alimentarius (2 de 2)

FAO JECFA Monographs 16

2

PURITY

<u>Water</u> (Vol. 4)	Anhydrous: Not more than 0.5% (Karl Fischer Method) Monohydrate: Not less than 7.5% and not more than 8.8% (Karl Fischer Method)
<u>Sulfated ash</u> (Vol. 4)	Not more than 0.05% (Method I, use 20 g sample)
<u>Oxalate</u> (Vol. 4)	Not more than 100 mg/kg Dissolve 1.0 g of sample in 4 ml of deionized water, and proceed according to the Oxalate Limit Test (Volume 4). The absorbance of the solution, read at 520 nm, is not more than that of a standard solution. Prepare the standard solution by dissolving 100 mg of oxalic acid (140 mg oxalic acid dehydrate) in 1000 ml of deionized water and dilute 1 ml with 3 ml of deionized water.
<u>Sulfates</u> (Vol. 4)	Not more than 150 mg/kg Test 20 g of the sample by the Sulfates Limit Test (Volume 4) using 6.0 ml of 0.01N sulfuric acid in the standard
<u>Readily carbonizable substances</u>	Heat 1.0 g of sample with 10 ml of 98% sulfuric acid in a water bath at $90 \pm 1^\circ$ for 60 min. No colour darker than <i>Matching Fluid K</i> (25°) should be produced (not more than 0.5 absorbance units at 470 nm in a 10 mm cell).
<u>Lead</u> (Vol. 4)	Not more than 0.5 mg/kg Determine using an AAS (Electrothermal atomization technique) appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on the principles of the methods described in Volume 4 (under "General Methods, Metallic Impurities").
METHOD OF ASSAY	Weigh, to the nearest mg, 2.5 g of the sample and place in a tared flask. Dissolve in 40 ml of water and titrate with 1 N sodium hydroxide, using phenolphthalein TS as the indicator. Each ml of 1 N sodium hydroxide is equivalent to 64.04 mg of $C_6H_8O_7$.

ANEXO 5

Descripción de uso del KWIK-STIK

KWIK-STIK™ devices contain a lyophilized pellet of a single stain of microorganism or a defined mixed population of microorganisms. The selection of KWIK-STIK™ microorganisms supports quality assurance programs in microbiology laboratories providing clinical diagnostic services and a wide variety of testing services.



KWIK-STIK™

Also for KWIK-STIK™ Plus & EZ-COMPTM

Simply Efficient

<p>1</p> <p>Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK™.</p>	<p>2</p> <p>Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record.</p>	<p>3</p> <p>Pinch the bottom of the ampule in the cap to release the hydrating fluid.</p>
<p>4</p> <p>Hold vertically and tap to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet.</p>	<p>5</p> <p>Crush the pellet and mix in fluid using a pinching action.</p>	<p>6</p> <p>IMMEDIATELY saturate swab in hydrated suspension.</p>
<p>7</p> <p>Inoculate the primary culture plate(s) by using pressure and rolling the swab in a circular area approximately 25 mm in diameter.</p>	<p>8</p> <p>Using a sterile loop, streak through the inoculated area approximately 10-20 times and streak to facilitate colony isolation.</p>	<p>9</p> <p>Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK™.</p> <p>10</p> <p>IMMEDIATELY incubate the inoculated primary culture plate(s).</p>

MicroBioLogics

Page 1 of 1
LIT.095 Rev.2004.06.14

ANEXO 6

Ficha técnica de *Aspergillus niger* ATCC 16888 (1 de 2)




ATCC


Product Sheet

***Aspergillus niger* (ATCC® 16888™)**

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Aspergillus niger* (ATCC® 16888™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Strain Designation: WB 326 [CBS 554.65, IMI 50566, NRRL 326, 2766]

Deposited Name: *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorph

Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.



Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 325: Malt extract agar (Blakeslee's formula)
ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar
ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar (PDA)

Growth Conditions

Temperature: 25°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For freeze-dry (lyophilized) ampoules:

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed for **at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. *Inspect for growth of the inoculum/strain regularly.* Viability is typically noticeable *after 1-2 days* of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.



Notes

No special notes.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



DNA Sequence

No DNA sequencing was performed in house on this product.



Isolation

Not available.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC


Ficha técnica de *Aspergillus niger* ATCC 16888 (2 de 2)




Product Sheet

Aspergillus niger (ATCC® 16888™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
**Frozen: -80°C or
colder**
**Freeze-Dried: 2°C
to 8°C**
**Live Culture: See
Propagation
Section**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Aspergillus niger* (ATCC® 16888™)

lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [07/31]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

ANEXO 7

Ficha de seguridad de material microbiológico (1 de 4)



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

MSDS FOR MICROBIAL CULTURES (Biosafety Level 1 or 2 or 3)

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

SECTION 1 - SUBSTANCE IDENTITY AND COMPANY INFORMATION

Product Name: Various Microbial Cultures at Biosafety Level 1 or 2 or 3
ATCC Catalog #: Various

COMPANY INFORMATION: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
PO BOX 1549
MANASSAS, VA 20108

FOR INFORMATION CALL: 800-638-6597 or 703-365-2700
AFTER-HOURS CONTACT: 703-365-2710
CHEMTREC EMERGENCY: 800-424-9300 or 703-527-3887

SECTION 2 - COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Either frozen or growing cells shipped in liquid cell culture medium (a mixture of components that may include, but is not limited to: inorganic salts, vitamins, amino acids, carbohydrates and other nutrients dissolved in water). Frozen Cultures may also contain a 5%-10% solution of Dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant.

SECTION 3 - HAZARD IDENTIFICATION

HMIS Rating: N/A
NFPA Rating: N/A

This substance is not hazardous as defined by OSHA 29CFR 1910.1200 however this product should be handled according to good lab practices, with proper personal protective equipment, proper engineering controls and within the parameters of the purchaser's safety program.

Health Hazards

ATCC recommends that all ATCC microbial cultures be handled by qualified microbiologists using appropriate safety procedures and precautions. Detailed discussions of laboratory safety procedures are provided in **Laboratory Safety: Principles and Practice** (Fleming et al) and in the U.S. Government Publication, **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**. This publication is available in its entirety in the Center for Disease Control Office of Health and Safety's web site at <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.

Information on the classification of human etiologic agents on the basis of hazard can be found as Appendix B in the NIH **Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules** at <http://grants.nih.gov/grants/policy/recombinentdnaguidelines.htm>.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108
July 2010

Emergency Telephone: (703) 365-2710 (24 hours)
Information Telephone: (703) 365-2700 Ext.2303

Chemtrec (800) 424-9300

Ficha de seguridad de material microbiológico (2 de 4)



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

SECTION 4 - FIRST AID MEASURES

Report to your Safety Office and Seek Medical Attention as Soon as Possible

Ingestion: If person is unconscious seek emergency medical attention; never give anything by mouth to an unconscious person. If the person is conscious wash mouth out with copious amounts of water and call a physician then administer three cupfuls of water. Do not induce vomiting unless directed to do so by a physician.

Inhalation: If person is unconscious seek emergency medical attention, if person is conscious remove to fresh air and call a physician.

Dermal exposure: Immediately wash skin with copious amounts of water followed by washing with soap and copious amounts of water. Remove all contaminated clothing.

Eye exposures: Flush eyes with copious amounts of water for at least 15 minutes with eyelids separated and call a physician.

SECTION 5 - FIRE FIGHTING MEASURES

Flammability: Data not available

Suitable Extinguishing Media: Water spray, carbon dioxide, dry chemical powder, Halon (where regulations permit), or appropriate foam.

Firefighting

Protective Equipment: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent inhalation, ingestion, skin and eye contact.

Specific Hazard(s): Responders should take into consideration the biohazard risk associated with responding to a fire in the area where the material may be stored or handled.

SECTION 6 - ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Procedure(s) of Personal Precaution(s): At a minimum use PPE listed in Section 8. Wear laboratory coat, gloves and eye protection. Avoid all contact.

Methods for Cleaning Up

Patient/Victim: Wash with soap and water. Work clothes should be laundered separately. Launder contaminated clothing before re-use. Do not take clothing home.

Equipment/Environment: Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with paper towel and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the center; allow sufficient contact time before clean up (30 min).

Note: The use of additional PPE may be necessary for cleaning solutions.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108
July 2010

Emergency Telephone: (703) 365-2710 (24 hours)
Information Telephone: (703) 365-2700 Ext.2303

Ficha de seguridad de material microbiológico (3 de 4)



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

SECTION 7 - HANDLING AND STORAGE

Handle and store according to instructions on product information sheet and label.

Special Requirements:

Follow established laboratory procedures when handling material.

SECTION 8 - EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

Use Personal Protective Equipment: Including Eye Protection, Chemical Resistant Gloves, and appropriate clothing to prevent skin exposure. In addition, a Respiratory protection program that complies with OSHA 29 CFR 1910.134 and ANSI Z88.2 requirements or European Standard EN 149 must be followed whenever workplace conditions warrant respirator use.

Engineering Controls: The use and storage of this material requires user to maintain and make available appropriate eyewash and safety shower facilities. Use fume hood or other appropriate ventilation method to keep airborne concentrations as low as possible.

Exposure Limits: No exposure limits for this material have been established by ACGIH, NIOSH, or OSHA.

SECTION 9 - PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Data Not Available

SECTION 10 - STABILITY AND REACTIVITY

Hazardous polymerization will not occur.

SECTION 11 - TOXICOLOGICAL INFORMATION

Route of Exposure

Eye Contact: Data not available. Avoid eye contact.

Skin Contact: Data not available. Avoid skin contact.

Skin Absorption: Data not available. Avoid skin absorption.

Inhalation: Data not available. Avoid inhalation.

Ingestion: Data not available. Avoid ingestion.

Parenteral Exposure: Data not available. Avoid parenteral exposure.

Sensitization

Skin: Data not available

Respiratory: Data not available

Target Organ(s) or System(s): Data not available

Signs and Symptoms of Exposure

Skin and Mucous Membranes: Data not available

Respiratory: Data not available

Gastrointestinal: Data not available

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108
July 2010

Emergency Telephone: (703) 365-2710 (24 hours)
Information Telephone: (703) 365-2700 Ext 2303

Chemtrec (800) 424-9300

Ficha de seguridad de material microbiológico (4 de 4)



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

Toxicity Data: Data not available
Effects of Long Term or Repeated Exposure: Data not available
Chronic Exposure–Teratogen: Data not available
Chronic Exposure–Mutagen: Data not available
Chronic Exposure–Reproductive Hazard: Data not available

SECTION 12 - ECOLOGICAL INFORMATION

No ecological information available.

SECTION 13 - DISPOSAL CONSIDERATIONS

Decontaminate all wastes before disposal (steam sterilization, chemical disinfection, and/or incineration).

Dispose of in accordance with applicable regulations.

SECTION 14 - TRANSPORT INFORMATION

Contact ATCC for transport information.

SECTION 15 - REGULATORY INFORMATION

Contact ATCC for regulatory information.

SECTION 16 - OTHER INFORMATION

THE INFORMATION PRESENTED IN THIS DOCUMENT IS BELIEVED TO BE CORRECT BASED UPON DATA AVAILABLE TO ATCC. USERS SHOULD MAKE AN INDEPENDENT DECISION REGARDING THE ACCURACY OF THIS INFORMATION BASED ON THEIR NEEDS AND DATA AVAILABLE TO THEM. ALL SUBSTANCES AND MIXTURES MAY PRESENT UNKNOWN HAZARDS AND ALL NECESSARY SAFETY PRECAUTIONS SHOULD BE TAKEN. ATCC ASSUMES NO LIABILITY RESULTING FROM USING OR COMING IN CONTACT WITH THIS SUBSTANCE.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108
July 2010

Emergency Telephone: (703) 365-2710 (24 hours)
Information Telephone: (703) 365-2700 Ext.2303

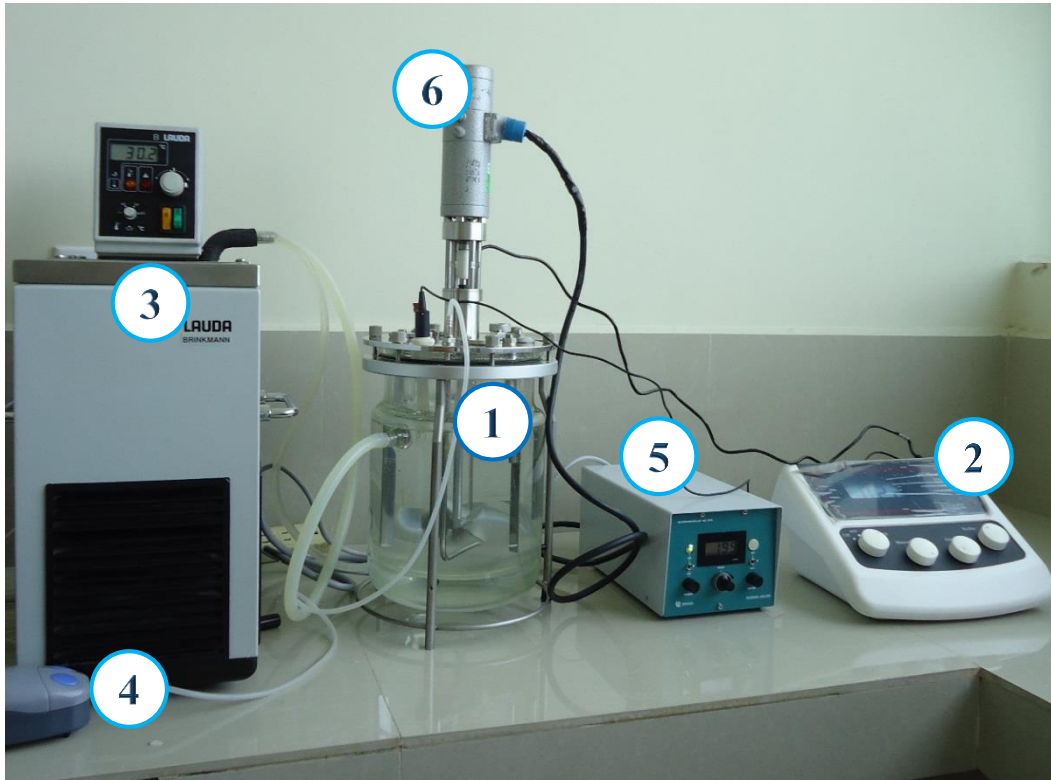
ANEXO 8

Ficha técnica del Hidróxido de calcio

		Technical Data Sheet Ficha de Datos Técnicos Fiche de données techniques	
Calcium hydroxyde Calcio hidróxido Calcium hydroxyde		Analytical Grade Ph Eur, USP, BP $\text{Ca}(\text{OH})_2$	
Slaked lime / Cal apagada / Chaux éteinte			
MW	74,09	Taric Code	2825 90 19 00
CAS	1305-62-0	IMDG	PAX
EC	215-137-3	ADR	CAO
EC INDEX	IATA		
Safety (H and P phrases) / Seguridad (frases H y P) / Sécurité (phrases H et P)			
H318-H315-H335			
P280-P261-P302+P352-P305+P351+P338-P304+P340-P501			
			
Assay/Pureza/Pureté >96%			
Specifications/Especificaciones/Specifications			
Calcium carbonate (as CaCO_3) < 3%		Heavy metals (as Pb) < 0.05%	
Substances insoluble in Hydrochloric acid < 0.1%		Iron(Fe) < 0.05%	
Chloride (Cl) < 0.03%		Substances not precipitated by ammonium oxalate (as SO_4) < 2.5%	
Sulphate (SO_4) < 0.1%			
Reference	Packaging		
CAHY-90A-500	plastic bottle / botella de plástico / flacon en plastique (500 g)		
 Note: Material safety data sheets and certificates of analysis are downloadable free of charge at www.labbox.com or www.labkem.com Disclaimer: labkem chemical products are exclusively for use in laboratory and by instructed and experienced technicians. These chemical products may be dangerous, so please follow instructions mentioned on the Material safety data sheets. Due to shipping restrictions or local/ national regulations, all products may not be available in all countries or for some particular customers.			
 Nota: Fichas de seguridad y certificado de análisis descargables gratuitamente en www.labbox.com o www.labkem.com Atención: los productos químicos labkem son para uso exclusivo de laboratorio y reservados sólo para uso profesional por parte de técnicos debidamente formados y cualificados. Los productos químicos son peligrosos, respete las instrucciones contenidas en la ficha de seguridad. Debido a restricciones en el transporte o a normativas especiales aplicables, ciertos productos químicos pueden no estar disponibles en todos los mercados o para todas las tipologías de clientes. Para cualquier aclaración consulte con Atención al Cliente			
 Remarque : Fiches de sécurité et certificats d'analyses téléchargeables sur www.labbox.fr ou www.labkem.com Attention : les produits chimiques labkem sont réservés exclusivement à un usage professionnel en laboratoire par des techniciens formés et qualifiés. Les produits chimiques sont dangereux, respecter les instructions contenues dans les fiches de sécurité. En raison des restrictions de transport ou de normes spéciales, certains produits chimiques peuvent ne pas être disponibles pour tous les pays ou types de clients.			
labbox labware s.l. Remences, 102 - 08304 Mataró (Barcelona) SPAIN Tel.: +34 937 552 084 - Fax.: +34 937 909 532 E-mail: info@labkem.com - Web: www.labkem.com			

ANEXO 9

Partes del biorreactor



- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 1. Frasco de fermentación | 2. Potenciómetro |
| 3. Controlador de temperatura | 4. Sistema de aireación |
| 5. Regulador del agitador | 6. Rotor |

ANEXO 10

Descripción del proceso para la obtención de ácido cítrico

Propagación de cepa *Aspergillus niger* ATCC 16888



Kwik Stik *A. niger*



Cepa de *Aspergillus niger*

Etapa de fermentación



Vertido de sustrato (melaza)



Fermentación

Etapas de purificación



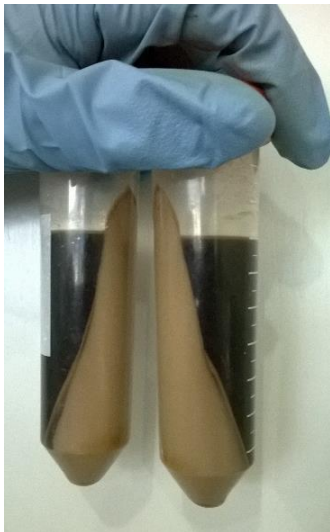
Adición de hidróxido de calcio



Formación del citrato
cálcico



Primer lavado



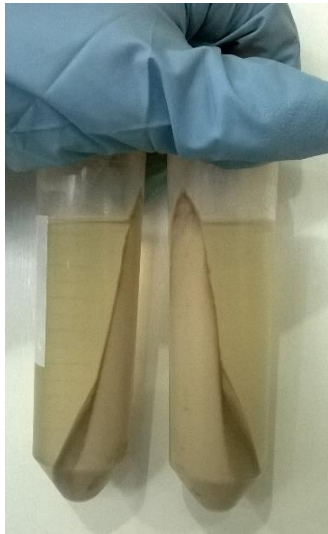
Segundo lavado



Tercer lavado



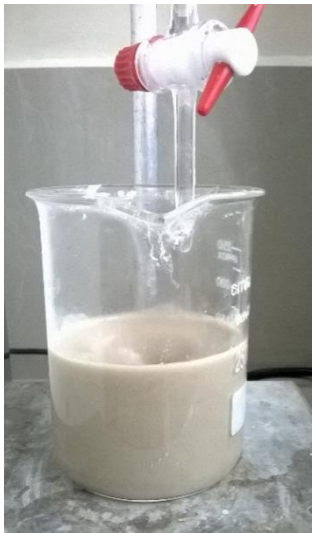
Cuarto lavado



Quinto lavado



Octavo lavado



Formación del sulfato cálcico



Ácido cítrico líquido

Etapa de cristalización



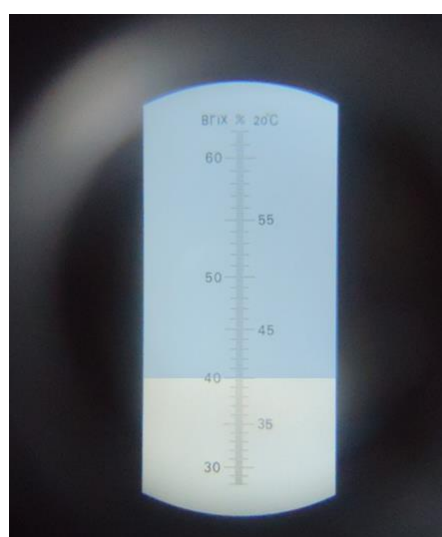
Evaporado



Preparación de solución semilla



Medición de pH



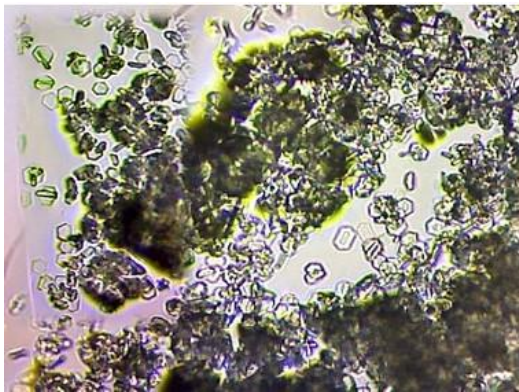
Medición de °Brix



Concentrado



Pesado del producto final



Formación de cristales de ácido cítrico
vista al microscopio 10x



Ácido cítrico